

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ IBN KHALDOUN DE TIARET
INSTITUT DES SCIENCES VÉTÉRINAIRES
DÉPARTEMENT DE SANTE ANIMALE

PROJET DE FIN D'ÉTUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

SOUS LE THEME

***Intérêt de l'Interprétation des frottis
Vaginaux chez la chienne lors du suivi des
chaleurs***

PRÉSENTÉ PAR :

Mr. BELMEDJAHED MUSTAPHA

ENCADRÉ PAR :

Dr. SLIMANI KHALED



Remerciements et dédicaces

Remerciements

Au terme de ce travail, je remercie **DIEU** tout puissant qui m'a donné la force et la volonté d'achever cette réalisation et je lui rends grâce.

Mes Sincères remerciements s'adresse en premier lieux à Monsieur **SLIMANI Khaled** mon encadreur pour sa bienveillance et pour ces conseils judicieux qui mon permis d'approfondir mes connaissances en reproduction chez l'espèce canine.

A mes parents

Pour m'avoir si bien soutenue durant mes études, pour leurs conseils, leur patience et leur bienveillance ce qui ma permis d'être aujourd'hui se que je suis. Merci de m'avoir si bien guidé dans ma vie. Je leur dédie cette thèse.

A ma mère, qui m'a toujours soutenue et encouragée. Merci d'être la meilleure des mamans!

A mon père, qui est pour moi un modèle de réussite et qui me pousse toujours à aller plus loin et plus haut.

A mon frère et à mes sœurs, pour tous nos moments de complicité passés et futurs.

A Nabil, pour ta présence et ton soutien, pour toutes les aventures que nous avons vécues ensemble et celles qui sont à venir.

A mes amis

Avec qui j'ai passé des moments inoubliables pendant mon cursus universitaire :

Younes, Zahi, Zine el Abidine, Sahraoui et Abd El Kader

Un remerciement, bien particulier pour mon amie et collègue, **Fatiha** qui m'a beaucoup aider et encourager durant mes cinq années d'études

Et un remerciement à toute l'équipes du service pathologie des carnivores

Khadîdja et Zahira

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE	02
LISTE DES ABREVIATIONS	06
LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES	07
INTRODUCTION	11
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	12
1. L'ANATOMIE DE L'APPAREIL GENITAL DE LA CHIENNE	13
1.1. Les ovaires	14
1.2. Les trompes utérines	15
1.3. L'utérus	15
1.4. Le vagin	15
1.5. Le vestibule du vagin	15
1.6. La vulve	16
1.7. Les mamelles	16
2. RAPPELS PHYSIOLOGIQUE	17
2.1. La puberté	17
2.2. Le rythme des chaleurs et saisonnalité	18
a) Le rythme des chaleurs	18
b) La saisonnalité	20
2.3. La définition des différentes phases du cycle sexuel	21
a) Pro-œstrus	21
b) Œstrus	22
c) Métoestrus	22
d) Anoestrus	23
2.4. Endocrinologie du cycle sexuel	23
a) Les hormones	24
1) Les hormones hypothalamiques	24
2) Les hormones antéhypophysaires	24
- FSH	25

- LH -----	25
- Prolactine -----	26
3) Les hormones gonadiques -----	26
- Œstrogène -----	26
- Progestérone -----	26
- Relaxine -----	27
b) Profil hormonal du cycle -----	28
1) L'anostrus -----	28
2) Le pro-œstrus -----	29
3) L'œstrus -----	30
4) Le métoestrus -----	30
3. SUIVI DES CHALEURS -----	33
3.1. Importance du suivi des chaleurs -----	33
3.2. Les outils qui permettent de déterminer le moment de l'ovulation -----	33
3.3. Suivi pratique des chaleurs -----	35
3.4. Conclusion -----	35
4. LES FROTTIS VAGINAUX CHEZ LA CHIENNE -----	36
4.1. La technique -----	36
a) La méthode de prélèvement -----	36
1) Le prélèvement avec une pipette -----	36
2) Ecouvillonnage -----	36
b) La fixation du prélèvement -----	41
c) Les différentes techniques de coloration -----	41
1) Les colorations unichromes -----	41
- La coloration de May-Grünwald-Giemsa -----	41
- Le bleu de méthylène -----	42
2) Les colorations plurichromes -----	42
- La coloration de Harris Shorr -----	42
- La coloration de Papanicolaou -----	43
d) L'observation microscopique -----	45
4.2. Les types cellulaires -----	45

a) Les cellules de l'épithélium vaginal -----	46
1) Les cellules parabasales -----	46
2) Les cellules intermédiaires -----	47
- Les petites cellules intermédiaires -----	47
- Les grandes cellules intermédiaires -----	48
3) Les cellules superficielles -----	50
4) Autres cellules issues de l'épithélium vaginal -----	51
- Les cellules « metoestrales » -----	51
- Les cellules spumeuses ou « foam cells » -----	51
- Les cellules superficielles avec des corps cytoplasmiques -----	52
- Les cellules épithéliales contenant des grains de mélanine -----	52
- Les cellules néoplasiques -----	52
b) Les autres cellules -----	52
1) Les cellules sanguines -----	52
- Les érythrocytes -----	52
- Les leucocytes -----	53
2) Les cellules de la fosse clitoridienne -----	53
3) Les spermatozoïdes -----	53
4) Les bactéries -----	53
4.3. Les variations de la cytologie vaginale au cours du cycle œstral -----	54
a) Le pro-œstrus -----	54
1) Le pro-œstrus précoce -----	54
2) Le pro-œstrus moyen -----	54
3) Le pro-œstrus tardif -----	55
b) L'œstrus -----	56
c) Le métœstrus -----	59
1) Le métœstrus précoce -----	59
2) Le métœstrus moyen et tardif -----	61
d) L'anostrus -----	62
e) La transition anoestrus-proestrus -----	63
5. DIAGNOSTIC ET SUIVI DE LA GESTATION -----	64

5.1. Anamnèse-----	64
5.2. Examen clinique -----	65
5.3. Examens complémentaires -----	66
a) Les analyses sanguines -----	66
1) Paramètres hématologiques -----	66
2) Paramètres biochimiques -----	66
b) Les dosages hormonaux -----	67
c) L'imagerie médicale -----	68
1) La radiographie -----	68
2) L'échographie -----	68
6. PROTOCOLES D'INDUCTION DES CHALEURS CHEZ LA CHIENNE -----	70
6.1. Protocoles utilisant des anti-prolactines -----	70
6.2. Protocoles utilisant des gonadotrophines -----	70
6.3. Utilisation d'agonistes de la GnRH -----	71
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE -----	72
1. MATERIEL ET METHODE -----	73
1.1. Les animaux -----	73
1.2. Protocole thérapeutique -----	74
1.3. Nature du traitement -----	74
1.4. Le suivi des chaleurs -----	75
1.5. Matériel utilisé -----	75
1.6. Colorant et protocole de coloration -----	76
a) Kits Diagnoestrus A&B -----	76
b) Kit RAL 5 5 5 -----	77
1.7. L'observation des lames -----	77
2. RESULTATS -----	79
3. DISCUSSION -----	101
CONCLUSION -----	104
BIBLIOGRAPHIE -----	105

LISTE DES ABREVIATIONS :

CJ : corps jaune

Cm: centimeter

ECG: equine Gonadotropine Hormone

FSH: Folliculo Stimulating Hormone

GnRH: Gonadotropine Releasing Hormone

HCG: human chorionic gonadotropine

J : jour

LH : Luteostimulating Hormone

Mm : millimètre

ng/ml : nannogramme par millilitre

PRL : prolactine

PMSG : pregnant mare serum gonadotropine

UI/kg : Unité par kilogramme

Mm : Micromètre

µg/kg : Microgramme par kilogramme

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES :

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE :

LES TABLEAUX :

Tableau n°1 : Age de la puberté dans certaines races -----	18
Tableau n°2: Avantages et inconvénients des deux outils-----	34
Tableau n°3 : coloration Diff-Quick ® -----	41
Tableau n°4 : Coloration de Harris – Shorr -----	43
Tableau n°5 : La coloration de Papanicolaou -----	44

LES FIGURES :

Figure 1 : Topographie de l'appareil génital femelle. -----	13
Figure 2 : Schéma de l'appareil génital de la chienne. -----	13
Figure 3 : Vue dorsale de l'appareil génital femelle -----	14
Figure 4 : Distribution de l'interoestrus chez la chienne -----	19
Figure 5 : Durée de l'interoestrus suivant chez les femelles gestantes (), et chez les non gestantes (□) en fonction du mois de l'année où elles ont présenté des chaleurs. -----	20
Figure 6 : Survenue du proestrus chez la chienne en fonction du mois de l'année (établi à partir de 1561 cycles -----	21
Figure 7 : Régulation hormonale du cycle (schéma simplifié) -----	24
Figure 8 : Concentration plasmatique de LH et de FSH chez une chienne Beagle de 5 ans pendant la période péri-ovulatoire -----	25
Figure 9 : Evolution hormonale (LH, progestérone et œstradiol) au cours du cycle sexuel chez la chienne gestante -----	28
Figure 10 : représentation schématique de la courbe de progestérone chez une chienne gestante et non gestante -----	32

Figure 11 : Rappels anatomiques et technique de prélèvement	38
Figure 12 : Technique de prélèvement par écouvillonnage	39
Figure 13 : Technique de prélèvement à l'aide d'un spéculum	40
Figure 14 : Etalement d'un écouvillon sur une lame de microscope	40
Figure 15 : Frottis vaginal de chienne coloré avec la méthode Diff-Quick ®	42
Figure 16 : Frottis vaginal pratiqué chez une femme et coloré avec la technique de Papanicolaou.	44
Figure 17 : Epithélium pavimenteux non kératinisé pluristratifié	45
Figure 18 : Cellules parabasales	46
Figure 19 : Petites cellules intermédiaires	47
Figure 20 : Grande cellule intermédiaire	48
Figure 21 : Les cellules du frottis vaginal	49
Figure 22 : Les cellules du frottis vaginal et leur processus de maturation	49
Figure 23 : Cellules superficielles kératinisées anucléées	50
Figure 24 : Cellules metoestralles	51
Figure 25 : Frottis de proestrus débutant	54
Figure 26 : Frottis de proestrus moyen	55
Figure 27 : Frottis de proestrus tardif	56
Figure 28 : Frottis d'œstrus	58
Figure 29: Représentation schématique de la cytologie vaginale rencontrée lors du proestrus, de l'œstrus et du metestrus	59
Figure 30 : Frottis de début de metoestrus	61
Figure 31 : Frottis de metoestrus	62
Figure 32 : Frottis d'anoestrus	63

Figure 33 : Diagnostic de gestation chez la chienne	64
--	----

PARTIE EXPERIMENTALE :

LES TABLEAUX :

Tableau n°6 : Données générales sur les animaux mis sous traitement	74
--	----

Tableau n°7 : Suivi des chaleurs avant la mise au traitement	79
---	----

Tableau n°8 : Suivi des chaleurs au cours du traitement	82
--	----

Tableau n°9 : Suivi des chaleurs physiologique	86
---	----

LES FIGURES :

Figure 34 : Technique de coloration HARRIS SHORR	77
---	----

Figure 35 : Technique de coloration May-Grunwald Giemsa	78
--	----

Figure 36 : Technique de prélèvement par écouvillonnage	90
--	----

Figure 37 : Ecouvillon rouge	90
-------------------------------------	----

Figure 38 : Etalement d'un écouvillon sur une lame	91
---	----

Figure 39 : fixation du frottis	91
--	----

Figure 40 : Cyto fixateur	92
----------------------------------	----

Figure 41 : kit de coloration HARRIS SHORR	92
---	----

Figure 42 : Kit de coloration May-Grunwald Giemsa	93
--	----

Figure 43 : frottis vaginal d'un début de pro-œstrus (zoom x-400)	93
--	----

Figure 44 : frottis vaginal début de pro-œstrus (zoom x-100)	94
---	----

Figure 45 : frottis vaginal de pro-œstrus (zoom x-400)	94
---	----

Figure 46 : frottis vaginal de pro-œstrus (zoom x-100)	95
---	----

Figure 47 : frottis vaginal de fin de pro-œstrus (zoom x-100)	95
--	----

Figure 48 : frottis vaginal de fin de pro-œstrus (zoom x-100) -----	96
Figure 49 : frottis vaginal fin de pro-œstrus (zoom x-400) -----	96
Figure 50 : frottis vaginal d'œstrus (zoom x-400) -----	97
Figure 51 : frottis vaginal d'œstrus (zoom x-400) -----	97
Figure 52 : frottis vaginal d'œstrus (zoom x-100) -----	98
Figure 53 : frottis vaginal d'œstrus (zoom x-100) -----	98
Figure 54 : frottis vaginal de mét-œstrus (zoom x-400) -----	99
Figure 55 : frottis vaginal de mét-œstrus (zoom x-400) -----	99
Figure 56 : frottis vaginal d'anoestrus (zoom x-100) -----	100
Figure 57 : frottis vaginal d'anoestrus (zoom x-400) -----	100

Introduction

Les études sur la reproduction chez la chienne ont débuté dès le début du XXème siècle. Ainsi en 1900 Walter Heape a défini les différentes phases du cycle sexuel. En 1931 Herbert McLean Evans et Herold Harrison Cole, ont les premiers, étudié les frottis vaginaux. Enfin, dans les années 60 et 70 de très nombreuses recherches ont permis de mieux connaître l'endocrinologie sexuelle femelle.

Par la suite, l'étude de la reproduction chez les carnivores domestiques a connu un essor très important. Celle-ci tend alors à ressembler à celle déjà pratiquée chez les animaux de rente : sélection des reproducteurs, recherche de la période optimale de fécondité, banques de semence et insémination artificielle.

L'étude des frottis permet de déterminer la période du cycle mais pas le moment précis de l'ovulation qui nécessite une association d'une étude du frottis avec un dosage du taux de progestérone car cette dernière connaît une augmentation de son taux sanguin au moment où l'ovulation se produit.

Au cours de notre expérimentation un suivi de reproduction basé sur l'étude des frottis vaginaux a été effectué sur un groupe de chiennes, dans le but de démontrer l'intérêt et l'importance de cette technique cytologique simple (étude des frottis vaginaux), peu coûteuse, facilement réalisable en clinique, et qui permet de déterminer avec exactitude le stade du cycle sexuel en mettant en évidence la modification cytologique des couches épithéliales vaginales.

Ainsi par l'usage de l'examen des frottis nous avons pu mettre en valeur un autre intérêt de cette technique qui se résume dans le choix d'un moment idéal afin d'entreprendre un traitement d'induction de l'œstrus. Ce traitement d'induction était une étape supplémentaire entreprise au cours de notre étude par l'administration d'un traitement à base d'anti-prolactine pendant une durée bien déterminée et de confirmer l'installation de remaniement ovarien par un examen des frottis vaginaux.

Etude bibliographique

1. L'ANATOMIE DE L'APPAREIL GENITAL DE LA CHIENNE

L'appareil génital femelle comprend la vulve, les organes internes et les mamelles. Les organes internes sont les ovaires, les trompes utérines, l'utérus et le vagin.

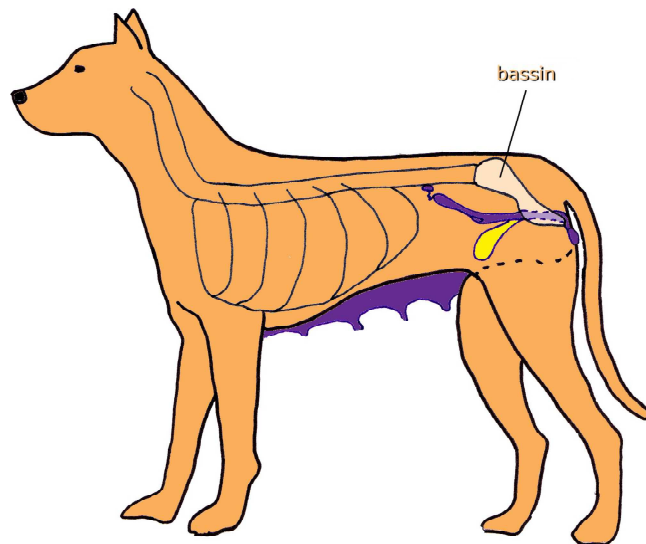


Figure 1 :
Topographie de l'appareil génital femelle.

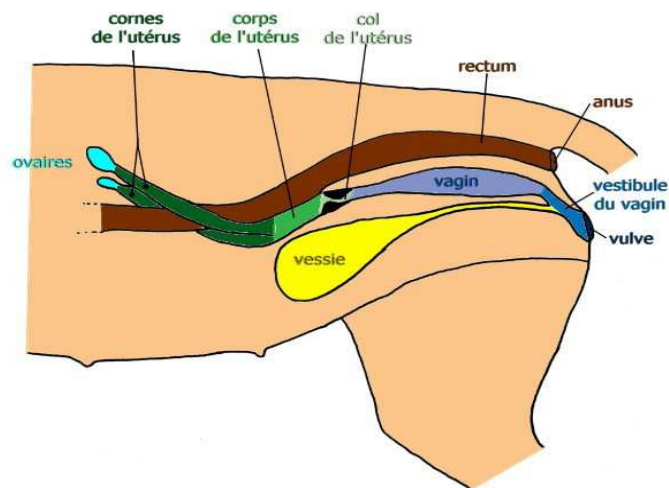
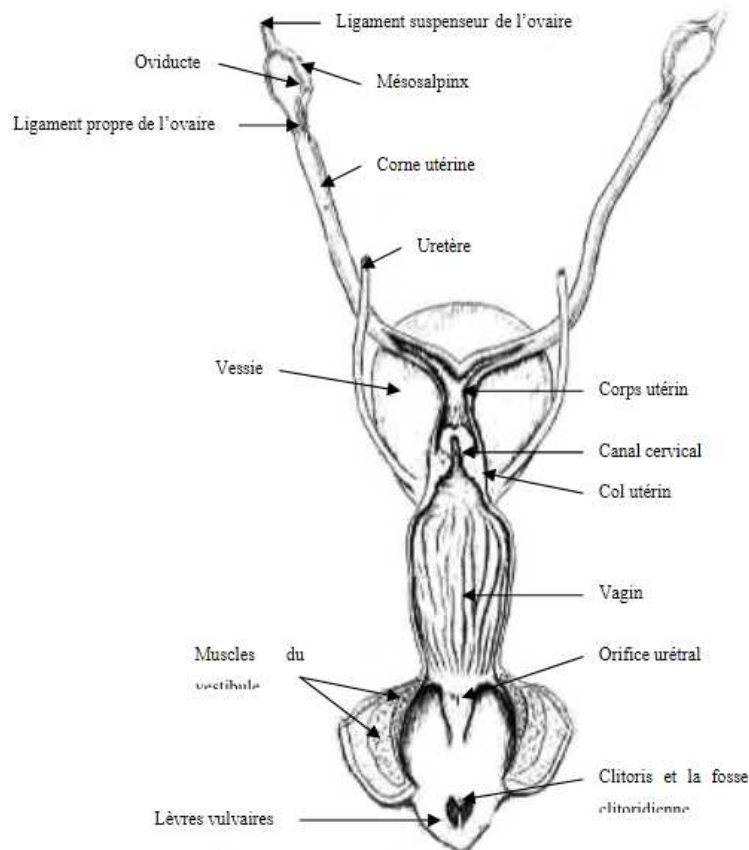


Figure 2 :
Schéma de l'appareil génital de la chienne.



Une ouverture est réalisée de la vulve jusqu'au début des cornes utérines.

Figure 3 : Vue dorsale de l'appareil génital femelle.

Il est important de connaître l'anatomie normale de l'appareil génital de la chienne, ainsi que ces variations aux cours du cycle afin de détecter toutes anomalies, pouvant entraîner un dysfonctionnement ou une pathologie. (Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS, 2001/ Done SH, Goody PC, Evans SA et al, 1996)

1.1. Les ovaires :

Sont situés en arrière des reins. Ce sont deux GONADES d'environ 1,5cm de long (chez une chienne de taille moyenne) qui produisent les OVOCYTES au cours d'un processus appelé ovogenèse et des hormones sexuelles femelles.

Les hormones produites sont la PROGESTERONE et les œstrogènes. Elles jouent un rôle primordial dans les modifications physiques et comportementales liées au cycle sexuel, le maintien de la gestation et le déclenchement de la mise bas.

1.2. Les trompes utérines :

Correspondent à l'extrémité des cornes de l'utérus, elles ont une forme d'entonnoir qui s'ouvre vers les ovaires. Elles recueillent les ovocytes libères par les ovaires au moment de l'OVULATION. C'est dans les trompes que se déroule la FECONDATION.

1.2. L'utérus :

De la chienne a une forme en Y avec un pied court et de très longues branches. Le pied du Y correspond au corps de l'utérus alors que les branches du Y représentent les cornes dans lesquelles se développeront les fœtus. Chez une chienne de taille moyenne, la longueur de l'utérus est environ de 18 cm (une quinzaine pour les cornes et 3 à 4 pour le corps). La paroi de ces cornes a une structure particulière composée de deux couches principales : l'ENDOMETRE et le MYOMETRE.

L'utérus communique avec le vagin par le **col de l'utérus**.

1.4. Le vagin :

Situe en arrière de l'utérus, accueille -avec le vestibule- le pénis du male lors de l'accouplement.

1.5. Le vestibule du vagin :

Est la partie des voies génitales située entre le vagin et la vulve.

Il fait partie (avec la vulve) du sinus uro-génital, c'est-à-dire de la partie commune des appareils urinaire et génital. En effet, c'est au niveau du plancher du vestibule que débouche l'URETRE, par un petit orifice appelé MEAT URINAIRE.

Le vestibule est coude : sa partie terminale, située proche de la vulve, est orientée presque verticalement vers le haut. Il fait ensuite un coude et devient horizontal. Lorsqu'un vétérinaire introduit un instrument (pour réaliser un frottis vaginal par exemple) dans le vagin, il s'oriente donc verticalement en direction du dos.

Le vestibule du vagin possède un muscle constricteur puissant qui se resserre en arrière du pénis du male lors de l'accouplement. Cela présente l'intérêt de prolonger l'érection et de favoriser les contractions du vagin qui aident à la remontée des spermatozoïdes. Du fait de cette particularité anatomique et de la présence de bulbes érectiles à la base du pénis, le male et la femelle restent accrochés l'un à l'autre et ne peuvent plus se séparer en fin d'accouplement, pour une durée variant de quelques minutes à une heure (cf. phase d'accolement). C'est pourquoi il ne faut jamais séparer deux chiens qui s'accouplent, sous peine de les blesser sérieusement.

1.6.La vulve :

Correspond à la partie externe des organes génitaux. Elle est composée de deux lèvres verticales réunies au niveau des COMMISSURES. La COMMISSURE ventrale (celle du bas) abrite le clitoris.

La vulve gonfle lors des chaleurs. Chez une chienne stérilisée elle reste petite. À l'inverse, chez une chienne MULTIPARE, elle peut rester volumineuse tout au long de l'année.

1.7.Les mamelles :

Ne font pas partie de l'appareil génital à proprement parler mais jouent un rôle dans la fonction de reproduction.

Elles sont au nombre de 5 paires (deux paires dites « thoraciques », situées de part et d'autre du STERNUM ; deux paires dites « abdominales », situées sous le ventre et une paire dite « INGUINALE », située entre les pattes arrières). Une chienne peut avoir une ou deux mamelles en plus ou en moins, cela n'a aucune conséquence et ne compromet pas une lactation future. Il faut cependant veiller à ne pas confondre une mamelle surnuméraire avec un KYSTE ou une tumeur ; en cas de doute ne pas hésiter à consulter son vétérinaire.

La taille des mamelles varie avec l'âge, le nombre de portées, l'état d'embonpoint de la chienne. En dehors des périodes de lactation, leur emplacement est presque uniquement marqué par la présence des PAPILLES (ou télines). Elles deviennent plus volumineuses pendant la lactation.

2. RAPPELS PHYSIOLOGIQUE

2.1. La puberté :

La puberté est définie comme le moment où la capacité à se reproduire est effective. Chez la chienne elle est mise en évidence par la survenue des premières chaleurs. Elle intervient entre le moment où les chiennes ont atteint 2/3 de leur poids adulte (Fontbonne et al. 2000) et la fin de leur croissance (Sokolowski 1977, Feldman et Nelson 1996).

Cependant il existe des variations très importantes intra et interraciales (cf. tableau I).

Le beagle, par exemple, présente ses premières chaleurs entre 7 et 10 mois en moyenne. Dans un cadre expérimental strictement défini, le premier proestrus est survenu entre 6 et 13 mois (Concannon 1987, Olson et al. 1984 b Johnston et al. 2001a, Sokolowski 1977).

La puberté débute entre 6 et 10 mois pour les chiennes de petit format. Bien que la survenue des premières chaleurs se produise aussi avant l'âge d'un an, les chiennes de grand format peuvent être impubères jusqu'à 18 voire 24 mois (Olson et al. 1984 d, Johnston et al. 2001a, Sokolowski 1977).

Le cycle œstral des chiennes pubères peut différer de celui des chiennes adultes.

Lors du premier cycle on peut observer de «fausses chaleurs» (« split heat » ou « false heat »).

Les chiennes présentent des signes de chaleurs tels que des écoulements vulvaires sérohémostatiques, un œdème vulvaire, ou l'attraction des mâles. Cependant après quelques jours, ces signes rétrocedent. On observera un véritable œstrus plusieurs semaines après (une semaine à deux mois) (Johnston et al. 2001a, Olson et al. 1984 d, Concannon 1987, Fontbonne et al. 2000).

Les chiennes pubères peuvent présenter également des chaleurs silencieuses, durant lesquelles une ovulation se produit en l'absence d'un comportement de proestrus et d'œstrus ou de signe clinique notable. (Johnston et al. 2001 a, Fontbonne et al. 2000).

Ceci s'explique par des concentrations circulantes très réduites de LH, d'œstradiol et de progestérone. (Wildt et al. 1978, Olson et al. 1984 d).

La capacité maximale de reproduction n'est pas atteinte avant le deuxième, troisième voire le quatrième cycle (Sokolowski 1973, Feldman et Nelson 1996). C'est pourquoi une chienne ne doit être mise à la reproduction qu'à partir de l'âge de deux ans, et après que le propriétaire ait observé un cycle sexuel normal et complet (Feldman et Nelson 1996).

Tableau n°1: Age de la puberté dans certaines races (d'après Johnston et al. 2001 a).

Races	Poids adulte (kg)	Age à la puberté (mois)	Races	Poids adulte (kg)	Age à la puberté (mois)
Airedale Terrier	22	15	Mastiff	57	11-12
Akita Inu	43	5	Montagne des Pyrénées	41	12
American Staffordshire Terrier	22	10	Petit Lévrier Italien	3	18-24
Barzoi	34	15-18	Pinscher	3	8-14
Basenji	10	10	Rottweiler	39	8
Bearded Collie	20	8-12	Saint Bernard	68	9-15
Berger Australien	16	6-18	Saint Hubert	41	12
Bichon Frisé	8	8-9	Saluki	20	8-24
Border Collie	19	6-8	Samoyede	18	jusqu'à 12
Bouvier Bernois	29	9-12	Schipperke	8	12-24
Boxer	28	8-24	Setter Anglais	27	7-20
Bull Terrier	20	7-11	Spitz Loup	18	8-18
Bulldog	45	6-16	Tervueren	32	10-12
Caniche moyen	29	12-15	Welsh Corgi	11	9
Carlin	7	9-12	Welsh Springer Spaniel	17	12
Cavalier King Charles	8	6-9	Whippet	10	12-24
Clumber Spaniel	24	jusqu'à 24	Yorkshire Terrier	3	8-16
Dogue Allemand	45	jusqu'à 18			
Epagneul breton	16	9-12			
Golden Retriever	29	9-11			
Greyhound	29	11-30			
Griffon Bruxellois	4	jusqu'à 18			
Irish Wolfhound	33	jusqu'à 16			
Komondor	49	12			
Lakeland Terrier	7	jusqu'à 24			
Lévrier Afghan	22	7-30			

2.2. Le rythme des chaleurs et saisonnalité :

a) Le rythme des chaleurs :

L'interœstrus est la période qui s'étend de la fin d'un épisode de chaleur jusqu'au début du proœstrus suivant.

Une chienne rentre en chaleur en moyenne tous les 7 mois avec un « intervalle moyen » de 5 à 11 mois (cf. figure 4). Ce rythme doit rester constant durant la majeure partie de la vie de l'animal (Concannon 1987, Johnston et al. 2001 a, Sokolowski 1977).

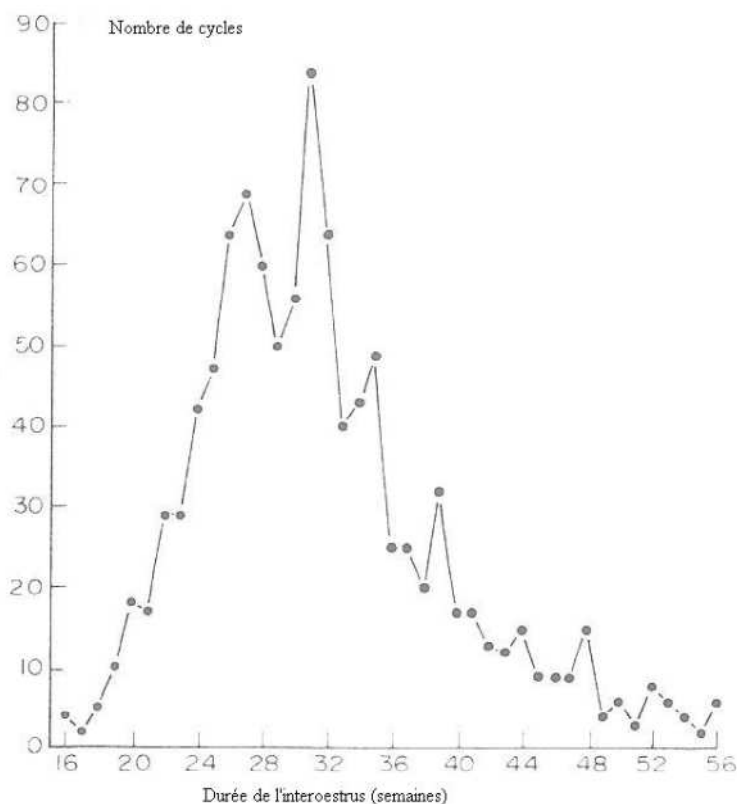


Figure 4 : Distribution de l'interoeustrus chez la chienne
(D'après 1094 cycles (Christie et Bell 1971a)).

Cet intervalle varie selon les individus d'un même type racial et selon les races (Concannon 1987, Christie et Bell 1971 b, Sokolowski 1970 et 1977).

Dans une étude effectuée sur des animaux de même race (des chiennes beagles), l'interoeustrus peut varier entre 3.5 et 13 mois (Concannon 1987).

Il apparaît que les chiennes de petit format ont souvent un interoeustrus plus court que celles de plus grand format. Cependant par exemple, le berger allemand présente plus de cycles œstraux que le boston terrier (Sokolowski 1970 et 1977). Il existe une exception concernant les chiennes de race africaine telle que le basenji ; celles-ci ne sont cyclées qu'une fois par an.

L'héritabilité de ce caractère a été estimée à 35% (Johnston et al. 2001 a).

A partir de l'âge de 5 à 7 ans selon les études, cet intervalle tend à augmenter de manière physiologique (Strasser et Schumacher 1968). Dans une expérimentation menée sur 12 chiennes

beagles par Andersen en 1973 (cité par Feldman et Nelson 1996), l'intervalle passe de 240 à 332 jours après qu'elles aient atteint 8 ans.

La gestation ainsi que la lactation augmenteraient également cet intervalle. (Christie et Bell 1971b, Linde-Forsberg et Wallèn 1992).

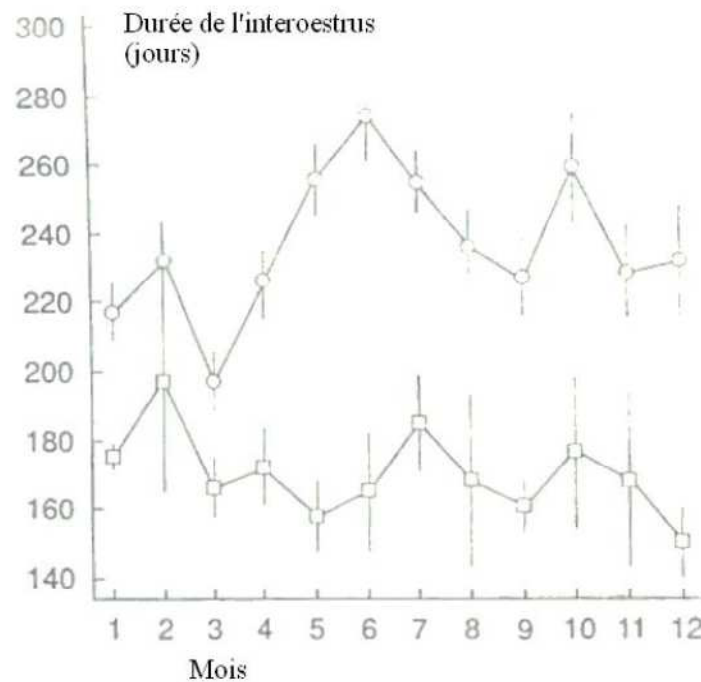


Figure 5 : Durée de l'interœstrus suivant chez les femelles gestantes (o), et chez les non gestantes (□) en fonction du mois de l'année où elles ont présenté des chaleurs.

(Linde-Forsberg et Wallèn 1992).

b) La Saisonnalité :

L'influence de la saison est moins marquée chez le chien que chez les canidés sauvages (Feldman et Nelson 1996). Les chaleurs sont observées sur l'ensemble de l'année. Cependant une étude qui a compilé les inscriptions de 87 880 chiots à l'American Kennel Club de 1971 à 1973, montre des valeurs plus élevées qui correspondent à l'oestrus. Il survient à la fin de l'hiver et pendant le printemps (Christie et Bell 1971a, Tedor et Reff. 1978, Linde-Forsberg et Wallèn 1992) (cf. figure 6).

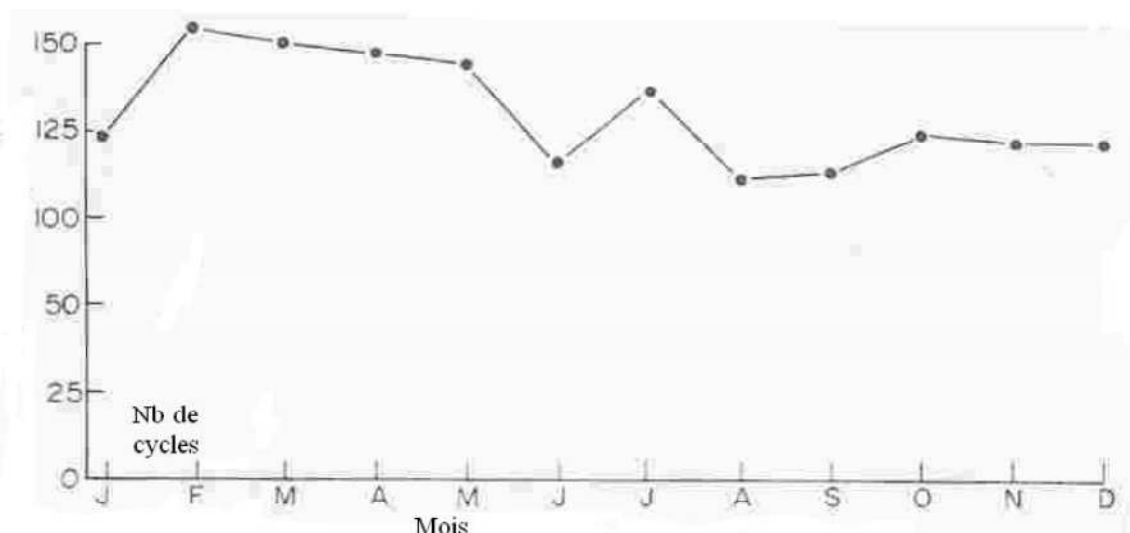


Figure 6 : Survenue du proestrus chez la chienne en fonction du mois de l'année (établi à partir de 1561 cycles (Christie et Bell 1971a)).

Cette saisonnalité est influencée par l'environnement. Des beagles maintenus en extérieur exprimaient ce pic en mai (Johnston, Olson et Kustritz 2001), ce que ne montraient pas des chiennes gardées en intérieur (Linde-Forsberg et Wallén 1992). Le rythme circadien de la prolactine chez les femelles vivant en extérieur pourrait expliquer ce fait (Kreeger et Seal 1992).

2.3. La définition des différentes phases du cycle sexuel :

Les 4 étapes du cycle ont été définies dès 1900 par Heape ; les concepts qu'il a introduit sont encore utilisés de nos jours.

Le proestrus correspond au début des chaleurs chez la chienne.

L'oestrus est la période de réceptivité sexuelle. Ce terme est dérivé du grec « oistros » qui signifie désir violent.

Le metoestrus ou diestrus est la phase lutéale et de réparation de l'endomètre.

L'anoestrus est la phase de repos sexuel.

a) Pro-œstrus

Le proestrus est défini cliniquement comme la phase du cycle où des modifications externes sous dépendance d'une très grande activité folliculaire qui précède l'œstrus. Il débute avec les premiers écoulements vulvaires et se clôt lorsque la femelle accepte l'accouplement. La durée moyenne de cette phase est de 9 jours (± 2 jours) (Feldman et Nelson 1996). Cependant, certains individus échappent à ces normes comme le montrent deux études : l'intervalle observé est de 3

à 22 jours pour l'une (Griffiths et Amoroso 1939) et de 0 à 27 jours pour l'autre (Christie et Bell 1971b).

L'attirance du mâle est due à la présence dans l'urine, les sacs anaux et les sécrétions vulvaires de phéromones sexuelles (Goodwin et al. 1979).

b) Œstrus

La période d'œstrus s'étend du premier jour où la chienne accepte la copulation jusqu'au jour où elle le refuse.

Sa durée moyenne est de 5 à 9 jours (Sokolowski 1977, Olson et al. 1984d, Feldman et Nelson 1996, Johnston et al. 2001a, Johnston 1988). Mais similairement au proœstrus, on peut trouver des valeurs extrêmes : 1 à 24 jours (Christie et Bell 1971b).

Il a été signalé que pour un même individu, la durée du proœstrus et de l'œstrus devait être constante d'un cycle à l'autre, entre l'âge de 2 et 6 ans (Olson et al. 1984d).

Cependant, il existe de telles variations intra et interraciales qu'il est difficile de prévoir ces intervalles pour un individu (Feldman et Nelson 1996).

La chienne devient réceptive (préparation psychologique de la chienne à l'accouplement et préparation des organes génitaux à la copulation) quand la concentration sérique en estradiol commence à chuter et que celle de progestérone augmente, soit au moment du pic de LH.

(Concannon et al. 1989).

c) Métoœstrus

Le métoœstrus est beaucoup plus difficile à définir et à être mis en évidence. Selon Heape «même s'il n'y a pas de fécondation pendant l'œstrus, une activité des organes génitaux subsiste pendant une période donnée qu'il appelle metœstrus » (Heape 1900).

Il est défini selon certains selon des critères hormonaux : il s'agit de la phase où l'imprégnation de progestérone est maximale (Feldman et Nelson 1996) due à la fin de la lutéinisation des corps jaunes et de leur phase d'état. Sokolowski (1977) choisit un critère histologique : la régénération de l'endomètre. La cytologie vaginale est modifiée avec la disparition progressive des cellules superficielles.

Holst et Phemister (1974 et 1975) donnent la définition la plus complète de cette phase en faisant la conjonction des critères précédents. Les modifications caractéristiques du comportement, histologiques et cytologiques sont dues à la présence de progestérone.

Il débute lorsque la femelle commence à refuser l'accouplement. Sa durée est d'environ 60 jours (avec un intervalle de 50 à 80 jours (Johnston 1988)). Trois situations peuvent survenir pendant cette phase :

1. La chienne n'a pas été fécondée, elle peut présenter une lactation de pseudo gestation sous l'influence de la progestérone.
2. La chienne n'a pas été fécondée et ne présente de lactation de pseudo gestation, cette phase sera suivie assez rapidement de l'anoestrus.
3. la chienne a été saillie et mettra bas.

d) Anoestrus

L'anoestrus est défini comme la période de repos sexuel. Il fait la transition d'un cycle à l'autre. Sa durée moyenne est de 150 jours avec un intervalle de 65 à 281 jours. (Shille 1989, Johnston 1988).

2 .4. Endocrinologie de la reproduction :

Le contrôle de l'activité gonadique fait intervenir le système neuroendocrinien. Par l'intermédiaire de neurotransmetteurs, le système nerveux régule l'axe hypothalamo-hypophysaire, qui lui-même oriente l'activité gonadique. (Figure 7)

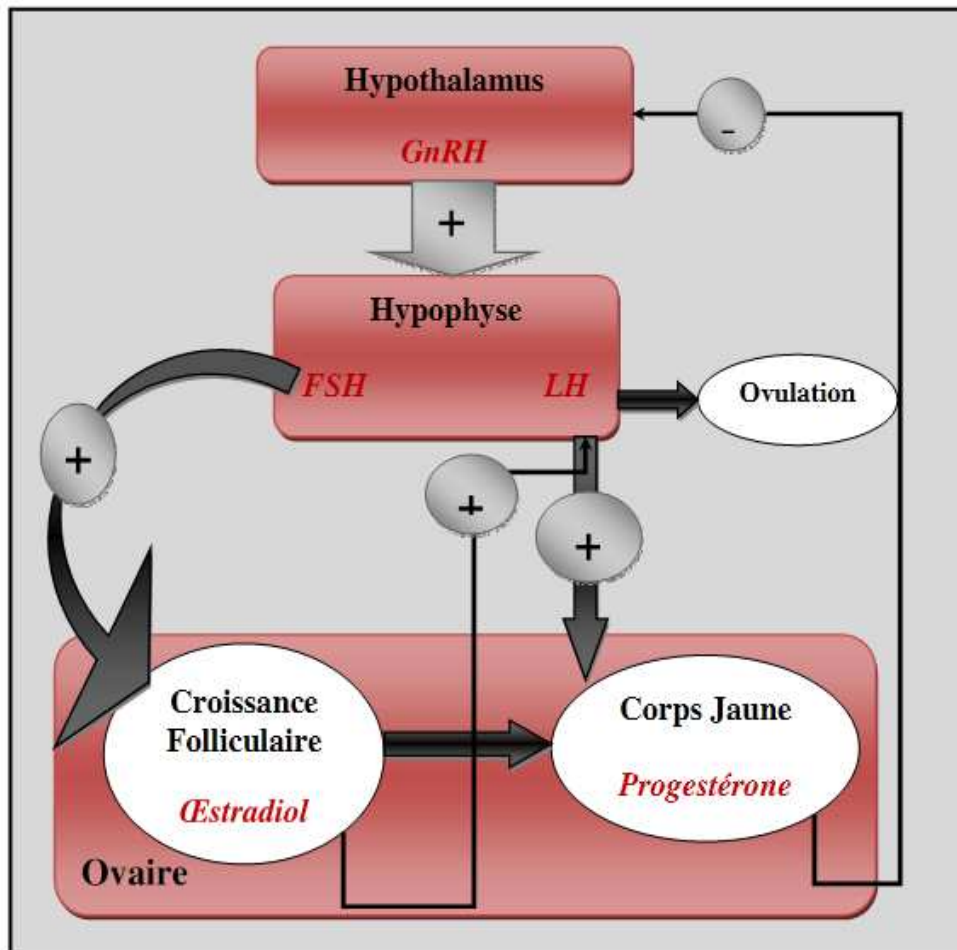


Figure 7 : Régulation hormonale du cycle (schéma simplifié)

a) Les hormones

1) Les hormones hypothalamiques

La GnRH (Gonadotrophin releasing hormone ou gonadolibérine) est sécrétée de manière pulsatile et permanente par l'hypothalamus. Elle stimule la synthèse de LH et de FSH. La libération de GnRH est influencée par des sollicitations nerveuses (ouïe, odorat, vue) et hormonales.

2) Les hormones antéhypophysaires

Ce sont les gonadotrophines (LH, FSH et Prolactine). Il s'agit de glycoprotéines synthétisées par le lobe antérieur de l'hypophyse.

Les taux sériques de LH et de FSH sont caractérisés par un niveau de base faible : la sécrétion tonique, soumise à de petites fluctuations rythmiques à peine perceptibles. Il se produit périodiquement un pic important de sécrétion de ces hormones : la sécrétion cyclique, peu avant l'ovulation. (Lennoz M, 1978) (Voir Figure 8)

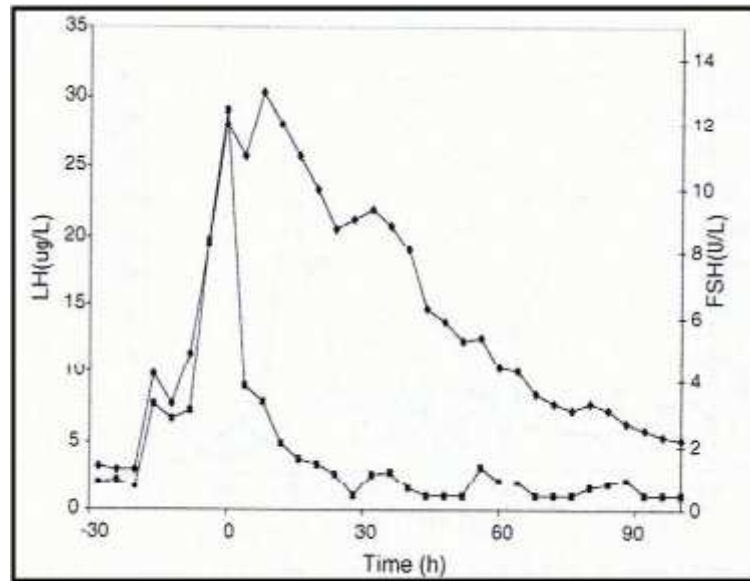


Figure 8 : Concentration plasmatique de LH et de FSH chez une chienne Beagle de 5 ans pendant la période péri-ovulatoire (De Gier et al).

L'alternance entre les sécrétions de LH et de FSH est régie par l'hypothalamus d'une part, et par les hormones gonadiques d'autre part.

➤ **FSH**

La FSH (Folliculo Stimulating Hormone) déclenche le retour en chaleurs de la chienne et stimule sa croissance folliculaire. Elle agit en synergie avec la LH en induisant la synthèse d'oestrogènes par les cellules de la thèque interne des follicules ovariens.

➤ **LH**

La LH (Luteostimulating Hormone) est l'hormone de la lutéinisation, sa durée de vie est plus courte que celle de la FSH. Elle active la maturation folliculaire, provoque l'ovulation et stimule la synthèse de progestérone par les corps jaunes ovariens. Elle est aussi responsable, chez la chienne, avec la prolactine, du maintien en activité de ces corps jaunes au cours de la gestation (action lutéotrope).

➤ **Prolactine**

La sécrétion de prolactine par les cellules lactotrophes de l'antéhypophyse est réglée par de multiples neurotransmetteurs et hormones. Le mécanisme de contrôle principal de cette sécrétion

est inhibiteur, il provient de neurones dopaminergiques à action anti-prolactinique situés dans l'hypothalamus.

La prolactine semble être responsable de certains changements comportementaux comme la fabrication de nid, et de l'apparition de la lactation. (Corre J, Rozenbaum M, 2004)

Cette hormone est également une hormone lutéotrope importante et semble être une condition absolue pour la sécrétion de progestérone à partir du trentième jour après ovulation. (Romagnoli S, 2006)

3) Les hormones gonadiques

➤ Œstrogènes

Ils sont présents principalement sous forme d'oestrone et de 17-_-oestradiol, sécrétés par les cellules de la thèque interne des follicules ovariens et par le corps jaune. Les oestrogènes sont responsables des manifestations comportementales et histologiques des chaleurs.

Ils ont pour effet :

- La congestion et l'oedème de la vulve et du vagin.
- La multiplication des cellules de l'épithélium vaginal, la kératinisation et la desquamation des cellules de la couche épithéliale superficielle.
- L'hyperplasie de l'utérus.
- L'augmentation de la contractilité de l'utérus et l'ouverture du col.

➤ Progestérone

Elle est principalement sécrétée par le corps jaune et accessoirement par les follicules ovariens matures. Cette lutéinisation pré-ovulatoire des cellules de la granulosa est une particularité du cycle sexuel de la chienne.

Les effets de cette hormone sur le tractus génital sont :

- la mucification du vagin
- l'épaississement de la muqueuse utérine et la préparation à la nidation
- l'inhibition de la motricité utérine et le maintien de la fermeture du col utérin
- la stimulation de l'activité sécrétoire de l'endomètre (prolifération des glandes)

La progestérone permet le maintien de la gestation en stimulant le développement de l'endomètre et du placenta et en inhibant les contractions utérines. Chez la chienne, l'unique source de progestérone est l'ovaire, il n'y a pas de relais placentaire, ce qui est une autre particularité de l'espèce canine. Une ovariectomie pendant la gestation conduit donc à un avortement.

Même si la progestéronémie des chiennes gestantes est similaire à celle des non gestantes pendant le dioestrus, elle ne reflète pas réellement la production ovarienne. En effet, la production de progestérone est significativement augmentée chez une liche gestante. Mais cette dernière présente également un métabolisme beaucoup plus important ce qui aboutit à une concentration importante des métabolites de la progestérone dans le plasma et les fèces. (Verstegen J, Onclin K, 2002)

La synthèse de progestérone par le corps jaune (CJ) est régulée par d'autres hormones:

- des hormones lutéotropes qui stimulent la synthèse de progestérone par le corps jaune:

- La prolactine (PRL) (à partir de 30 jours de gestation) : des anti-prolactiniques utilisés en fin de gestation entraînent un avortement.

- La LH : l'hypophysectomie provoque un avortement immédiat (Concannon 1980, Okkens et al. 1986)

Le rôle de ces hormones est surtout net lors du deuxième mois de gestation, les mécanismes lutéotropes lors du premier mois sont moins connus. La dépendance du corps jaune vis-à-vis de la prolactine et de la LH semble varier lors de la gestation. Le CJ est plus indépendant pendant le premier tiers de la gestation, et plus on est proche de pic de LH plus l'indépendance est grande. Il n'y a pas encore d'explications connues à ce phénomène. (Verstegen J, Onclin K, 2002)

- des hormones lutéolytiques, les prostaglandines F2_α, qui provoquent une diminution de la synthèse de progestérone après 10 à 15 jours de gestation. Ces dernières sont synthétisées en fin de gestation par l'utérus gravide, peut être en réponse à la sécrétion fœtale de cortisol.

➤ **Relaxine**

La relaxine est un polypeptide de la même famille que l'insuline, c'est actuellement la seule hormone connue, qui est spécifique de la gestation chez la chienne. Elle est sécrétée par le placenta dès la nidation.

Elle est détectable à partir de 3 à 4 semaines de gestation, son taux le plus élevé (4-6 ng/ml) est atteint 2 à 3 semaines avant la mise bas puis il commence à décliner dans les 48 heures précédant le part et reste à des valeurs comprises entre 0,5 et 2 ng/ml pendant 4 à 9 semaines. (Hoffmann B, 2004)

Le placenta est la principale source de relaxine mais sa sécrétion post-partum laisse supposer une production utérine et ovarienne. (Hoffmann B, 2004)

Elle joue un rôle important dans le maintien de la gestation : elle inhibe les contractions du myomètre et favorise la croissance utérine : dans la deuxième moitié de la gestation, elle est un protagoniste de la maturation cervicale car elle induit la prolifération épithéliale et stromale. Elle prépare également l'appareil génital au part en rendant plus élastique la ceinture pelvienne et en

dilatant le col de l'utérus et en induisant la formation de récepteurs à l'ocytocine. (Freville A, 2005)

b) Profil hormonal du cycle

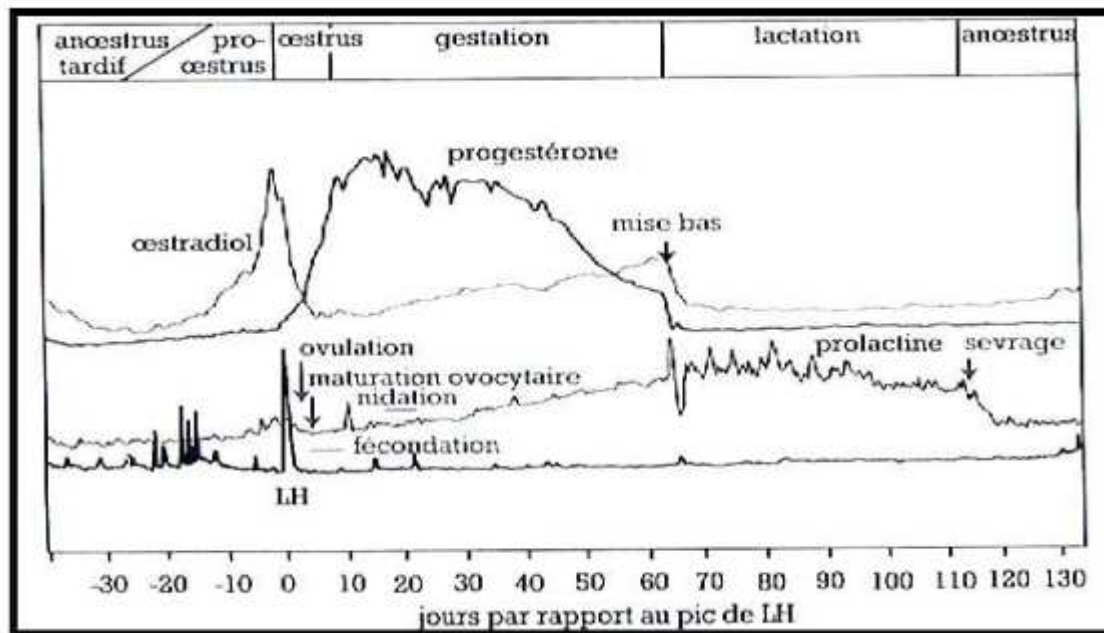


Figure 9 : Evolution hormonale (LH, progestérone et œstradiol) au cours du cycle sexuel chez la chienne gestante

1) L'anoestrus

Les concentrations d'œstradiol sont basales pendant l'anoestrus. Le taux de progestérone n'est jamais basal avant J130-J160 du cycle (J0 étant le pic de LH). Les valeurs les plus basses, entre 10 et 50 pg/ml, sont observées en milieu et fin d'anoestrus. La concentration en FSH est variable mais plus élevée que dans d'autres étapes du cycle, sauf pendant le pic pré-ovulatoire de GnRH. La LH présente une concentration variable mais basse en moyenne avec des pulses tous les moins de 8 à 12H. (Verstegen J, 2002)

2) Le pro-œstrus

- En début de pro-œstrus :

Juste avant le début du pro-œstrus, il y a une augmentation des fréquences pulsatiles de LH et de FSH. Les intervalles entre les pulses sont de 1-2 heures voire moins. Il en résulte une augmentation importante de la concentration moyenne de LH. L'origine de ces changements est

sans doute une augmentation de la fréquence pulsatile et de la magnitude des pics de GnRH et possiblement un changement de sensibilité de l'hypophyse vis-à-vis de cette hormone.

L'augmentation des concentrations de LH et surtout de FSH provoque la stimulation d'une « cohorte » de follicules ovariens qui se développent en follicules pro-œstraux sécrétant des œstrogènes. La chienne est de nouveau en chaleurs.

- Pendant le pro-œstrus :

Le développement rapide des follicules ovariens provoque l'élévation progressive de la concentration d'œstradiol circulante. Ceci a pour effet un déclin concomitant des taux de LH et de FSH (effet inhibiteur de l'œstradiol).

- En fin de pro-œstrus :

L'augmentation du relargage d'œstradiol aboutit à un pic qui prépare l'hypophyse et l'hypothalamus à une décharge massive de LH et de FSH. Le taux d'œstradiol passe d'une valeur basale située entre 2 et 10 pg/ml à une valeur située entre 50 et 120 pg/ml selon Goodman (Goodman M, 2001), entre 30 et 70 pg/ml. (Fontobonne A, Buff S, Garnier F, 2000). Cette augmentation se fait sur une période de 10 à 14 jours. (Goodman M, 2001) Le pic a lieu 2 à 3 jours avant le début de l'œstrus. (Goodman M, 2001) Les follicules ont atteint un plafond, ils combinent un métabolisme et une clairance élevés de l'œstradiol. Il en résulte un déclin de son taux. Cette baisse de sécrétion d'œstradiol provoque un pic de GnRH et un pic de LH présumés concomitants. (Concannon PW, 2005)

La progestéronémie augmente 24 à 48 heures avant le pic de LH, au moment de la chute du taux d'œstradiol. Cette sécrétion pré-ovulatoire de progestérone semble déterminante pour le déclenchement du pic de LH. Concannon a démontré que si la montée de la progestéronémie ne se fait pas et que le ratio Progestérone/Œstradiol reste inchangé alors le pic de LH ne se produit pas et il n'y a pas d'ovulation. (Verstegen J, Onclin K 2002)

Le pic de LH débiterait lorsque le taux de progestérone passe rapidement de valeurs basales, inférieures à 1 nmol/L, à des valeurs comprises entre 3 et 6 nmol/L. (Fontobonne A, Buff S, Garnier F, 2000) Cette augmentation rapide de la concentration de progestérone ne peut être dissociée chronologiquement de l'augmentation du taux de LH. (Concannon PW, 2005)

3) L'œstrus

- La phase pré-ovulatoire :

Le pic de LH est responsable de la croissance terminale rapide et de la lutéinisation des follicules pré-ovulatoires. Ainsi, sous son influence, des follicules de 3-4 mm de diamètre sécrétant des œstrogènes sont transformés en follicules de 8-9 mm de diamètres sécrétant de la progestérone.

Ce pic déclenche aussi l'ovulation. Il est souvent considéré comme le point central du cycle de la chienne, à partir duquel les événements sont datés (J0), il marque le début de l'œstrus endocrinologique alors que l'œstrus comportemental apparaît en moyenne à J1 avec des variations pouvant aller de J-3 à J+4 du cycle. (Concannon PW, 2005) La durée de la décharge ovulante semble varier de 1 à 3 jours. de 24 à 96h, dure en moyenne 3,3 jours. (Fontobonne A, Buff S, Garnier F, 2000), et 36+/-5 heures. (DE GIER. J, KOOISTRA.H.S, DJAJADININGRAT-LAANEN S.C, *et al*, 2006) Son taux sérique varie de 10 à 22 ng/ml. (Fontobonne A, Buff S, Garnier F, 2000) et est en moyenne de 18,7+/-5,8 ng/ml

Le pic de FSH précède également l'ovulation et dure trois fois plus longtemps que le pic de LH. Il s'étend sur 110+/-8 heures. Le métabolisme et la clairance de cette hormone sont plus lents. (Concannon PW, 2005)

- La phase ovulatoire :

Le pic pré-ovulatoire de LH déclenche l'ovulation 30 à 48 heures plus tard, cela peut dépasser 96h dans certains cas. On considère que l'ovulation a eu lieu lorsque le taux circulant de progestérone dépasse 5 à 10 ng/ml. ((Fontobonne A, Buff S, Garnier F, 2000)

Lors de l'ovulation les ovocytes n'ont pas encore achevés leur maturation, ils ne sont donc pas immédiatement fécondables car bloqués en prophase de la première division méiotique. La phase de maturation ovocytaire dure 48 heures.

- La phase post-ovulatoire :

Les concentrations de LH et de FSH retrouvent progressivement leurs valeurs basales. Le taux d'œstradiol décroît et atteint un niveau basal entre le 6ième et le 11ième jour de l'œstrus endocrinologique, moment où débute le metoestrus cytologique.

La progestéronémie augmente rapidement avec l'installation des corps jaunes, et atteint des valeurs comprises entre 10 et 25 ng/ml au cours des 48 heures suivant l'ovulation, moment où l'ovocyte devient mature. (Romagnoli S, 2006)

4) Le metoestrus

Que la chienne soit gestante ou non, le corps jaune sécrète de la progestérone à des taux élevés. Le taux circulant atteint un maximum entre le 15ième et le 30ième jour suivant le pic LH avec des valeurs variant de 15 à 90 ng/ml selon Goodman et de 15 à 80 ng/ml selon Blendinger, puis décline jusqu'à atteindre un taux inférieur à 1 ng/ml à J60-J70 post pic LH ce qui marque la fin du dioestrus. (Goodman M, 2001)

Les profils hormonaux d'une chienne gestante et d'une chienne non gestante sont très proches, cependant il existe quelques différences.

- Lors de gestation : (Voir Figure 9)

- Après son pic, la progestéronémie chute légèrement. Cependant une légère remontée se produit entre le 25ième et le 40ième jour (post LH). Puis le taux de progestérone diminue lentement et atteint, au dernier tiers de la gestation, un plateau de 4 à 16 ng/ml pendant 1 à 2 semaines. Enfin la concentration chute brutalement dans les 24 à 36 heures avant le part et atteint des valeurs inférieures à 2ng/ml 12 à 24 heures avant la parturition. (Goodman M, 2001) Cet effondrement est indispensable au déclenchement du part car il permet l'augmentation du nombre de récepteurs à l'ocytocine dans le muscle utérin.
- le taux d'œstradiol, devenu très faible au moment du pic de LH, remonte après le 25ième ou 30ième jour de gestation contribuant à la phase de croissance et de différenciation des acini mammaires (mammogénèse) et, plus tard à la préparation du part.
- La Relaxine, produite par le placenta de la chienne, est détectable 19 à 28 jours après le pic de LH. Sa sécrétion présente un pic à 4-6ng/ml entre le 40ième et le 50ième jour de gestation puis diminue avant terme. Elle devient indétectable 1 à 6 semaines après la parturition. (Romagnoli S, 2006)
- Le taux de prolactine augmente dès le deuxième tiers de la gestation et devient significativement élevé entre le 30ième et le 35ième jour après le pic de LH. La prolactinémie présente un pic lors de la parturition et reste élevée pendant la lactation jusqu'au sevrage des chiots. Les valeurs de prolactinémie montent à environ 40 ng/ml lors de la dernière semaine de gestation et atteignent approximativement 100ng/ml 1 à 2 jours avant le part puis le taux dépasse 100ng/ml 1 à 2 jours après la parturition. La prolactinémie s'élève en réponse à la succion exercée par les chiots. (Romagnoli S, 2006)

• Lors de non gestation :

- la progestéronémie ne présente pas de remontée après son pic, elle diminue progressivement à partir du deuxième tiers du metoestrus jusqu'à J50-J80 après le pic de LH.(Romagnoli S, 2006) (Voir figure 10)
- La prolactinémie reste basse pendant la deuxième moitié du metoestrus, _2ng/ml, sauf lors de pseudo gestation. En effet, certaines chiennes présentent lors de cette phase des modifications cliniques similaires à celles observées chez une chienne gestante, cela peut aller jusqu'à l'apparition d'une lactation de pseudo gestation deux mois après les chaleurs.

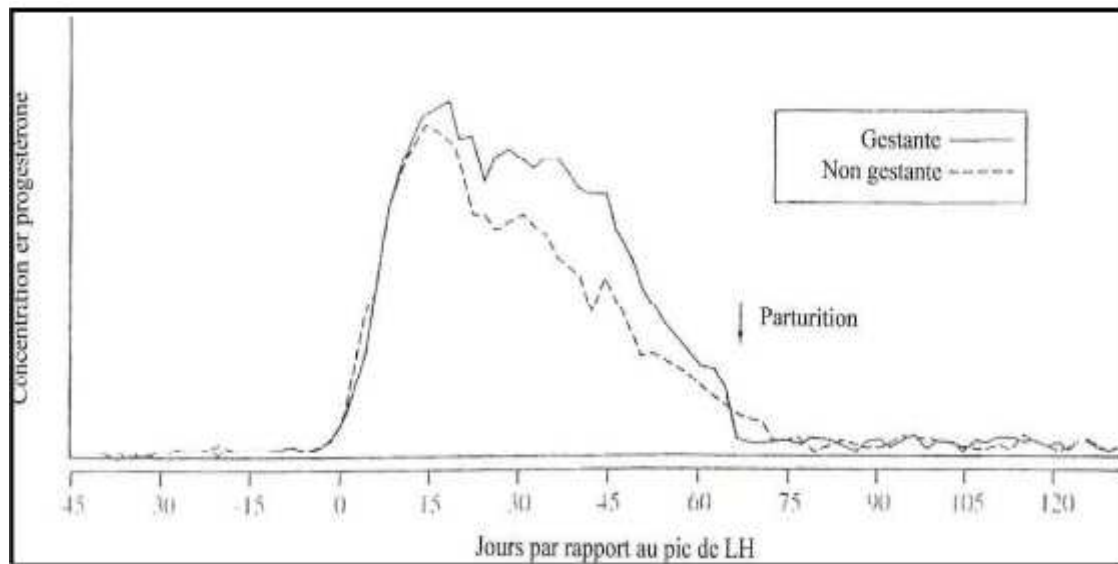


Figure 10 : représentation schématique de la courbe de progestérone chez une chienne gestante et non gestante d'après Baron

Le cycle hormonale de la chienne se traduit par :

- Un pic pré-ovulatoire de LH, 48h avant l'ovulation
- Une lutéinisation pré-ovulatoire des follicules avec production de progestérone avant l'ovulation
- Une croissance en plateau de la progestérone, suite à l'ovulation. Chez la chienne l'augmentation de la progestéronémie traduit l'ovulation et non la gestation.

3. SUIVI DES CHALEURS

3.1. Importance du suivi des chaleurs :

La chienne peut être souvent saillie avec succès pendant une période d'environ 6 jours (de 2 jours avant l'ovulation à 4 jours après). Cependant, le moment optimum de fécondation se situe deux jours après l'ovulation. En effet lorsque la chienne ovule, les ovocytes sont immatures, la maturation ovocytaire dure 48 heures.

Une saillie ou une insémination artificielle effectuée au moment optimum de fécondation augmentent la prolificité (taille de la portée) et la fertilité.

Lorsque la saillie est effectuée un peu en avance, il est possible qu'elle soit fécondante, du fait de la longue survie des spermatozoïdes dans les voies génitales de la femelle (jusqu'à une semaine) mais la probabilité que la saillie soit fécondante et la prolificité sont diminuées.

De plus, si une insémination artificielle utilisant une semence réfrigérée ou congelée est envisagée, la semence survit moins longtemps et il est indispensable qu'elle soit effectuée au moment optimum de fécondation. (Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS 2001/ fontobonne A, Buff S, Boender G 1998)

QUELQUES REPERES

- Le début des chaleurs correspond aux premières pertes vulvaires (normalement sanguines).
- L'ovulation survient environ 2 jours après le début de l'œstrus.
- Moment optimum de fécondation: 2 à 4 jours après l'ovulation (temps de maturation ovocytaire)
- Taux de progestérone plasmatique à l'ovulation: environ 5 ng/ml (entre 4 et 10 ng/ml)
- Taux de progestérone plasmatique au moment idéal de fécondation: très variable d'une chienne à l'autre : 12 à 50 ng/ml

3.2. Les outils qui permettent de déterminer le moment de l'ovulation :

La détermination du moment de l'ovulation utilise 2 outils principalement:

- Le frottis vaginal (dans les pays anglo-saxons : vaginoscopie)
- Le dosage de progestérone (Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS 2001/ fontobonne A, Buff S, Boender G 1998)

Récemment, d'autres techniques, comme l'échographie ovarienne ont été développées.

• EVOLUTION DE LA PROGESTERONE AU COURS DU CYCLE SEXUEL DE LA CHIENNE

- o Le taux basal de progestérone est < 2 ng/ml
- o Il y a une lutéinisation des follicules préovulatoires qui se mettent à sécréter de la progestérone avant que l'ovulation ne se produise. Ainsi, il y a une première augmentation du taux de progestérone de < 2 ng/ml à environ 2,5 ng/ml.
- o A l'ovulation, le taux de progestérone augmente brusquement, il est compris entre 4 et 10 ng/ml.
- o On considère que l'ovulation a eu lieu lorsque la valeur de 6 à 10 ng/ml est dépassée, de ce fait, la mesure de la progestéronémie est un témoin fiable de l'ovulation.
- o En période post ovulatoire, le taux de progestérone continue d'augmenter pouvant atteindre des valeurs comprises entre 15 et 90 ng/ml.
- o Au moment idéal de fécondation, le taux de progestérone plasmatique est très variable, il varie de 12 à 50 ng/ml.
- o A partir du troisième tiers de gestation, le taux de progestérone diminue, il se situe alors à un plateau allant de 4 à 15 ng/ml. Ces valeurs sont maintenues pendant 15 jours avant la mise bas, lorsque le taux devient inférieur à 2 ng/ml, la parturition est imminente (dans les 24 à 48 heures).

□ AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES DEUX OUTILS:

Tableau n°2 : Avantages et inconvénients des deux outils

	AVANTAGES	INCONVENIENTS
FROTTIS VAGINAL	Peu coûteux Résultat immédiat	Peu précis
DOSAGE DE PROGESTERONE	précis	Coût élevé Technique de dosage variable (quantitatif ou semi-quantitatif)

3.3. Suivi pratique des chaleurs

- Détermination du premier jour des chaleurs par les propriétaires = premières pertes vulvaires.
- Frottis vaginal à partir du 5ème jour des chaleurs et tous les deux jours jusqu'à l'obtention d'un frottis d'œstrus

Rq: si le premier frottis montre un état de proœstrus peu avancé, on peut se permettre d'attendre cinq jours avant d'effectuer le deuxième.

- Dosage de progestérone dès l'obtention d'un frottis d'œstrus:

☐ si taux < 2 ng/ml, pas d'ovulation à prévoir avant 48 heures, effectuer un dosage tous les deux jours jusqu'à l'obtention d'un taux d'environ 5 ou 6 ng/ml.

☐ Si taux = 5 ou 6 ng/ml: ovulation imminente, faire saillir ou inséminer dans les 48 heures.

Lorsque taux > 6 à 10 ng/ml, on peut être sûr que l'ovulation a eu lieu.

☐ Si taux > 40 ng/ml, on a très certainement dépassé l'ovulation de plus de 72 heures, ce qui est souvent très tard, voire trop tard, pour accoupler ou inséminer une chienne. L'obtention d'un frottis vaginal montrant un aspect de metoœstrus (présence de polynucléaires et/ou réapparition de cellules parabasales) permet d'indiquer au propriétaire que son animal n'est probablement plus fécondable.

3.4. Conclusion:

LES FROTTIS VAGINAUX : Permettent de déterminer le moment où commencer les dosages progestérone et permettent de certifier que la période de fécondabilité est dépassée

LES DOSAGES DE PROGESTERONE : Permettent de déterminer de manière précise le moment idéal de fécondation, ils ne permettent pas de déterminer quand ce moment est dépassé (en effet, la progestérone continue d'augmenter que la chienne soit gestante ou non)

4. LES FROTTIS VAGINAUX CHEZ LA CHIENNE

4.1. La technique :

a) La méthode de prélèvement :

Plusieurs méthodes pour le prélèvement des cellules vaginales exfoliées sont possibles. Le prélèvement doit être rapide, facile, avec un minimum d'inconfort pour la chienne, praticable à toutes les phases du cycle et permettant d'obtenir un échantillon cellulaire viable (Feldman et Nelson 1996, Neveux 1999, Johnston et al. 2001b).

1) Le prélèvement avec une pipette :

Cette méthode consiste à introduire sur toute sa longueur un compte-goutte médical dans le vagin. Celle-ci contient de 0.25 à 1 millilitre de solution saline stérile. On peut également rattacher la pipette à une seringue contenant au minimum 5 millilitres d'air pour pouvoir expulser le liquide dans la lumière vaginale.

La solution est injectée et réaspirée plusieurs fois. Puis la pipette est extraite du vagin en veillant à ne pas presser son extrémité. Il est probable que l'intégralité du sérum ne soit pas récoltée, mais il suffit d'une goutte pour obtenir une lame probante.

Une goutte du produit de récolte est déposée à l'extrémité d'une lame de microscope. Cette dernière est maintenue verticalement pour permettre l'écoulement du liquide sur l'ensemble de la longueur. Puis l'excédent est essuyé (Holst 1986, Roszel 1977, Guyant 1988, Olson et al. 1984 d, England 1992, Baker et Lumsden 2001).

Cette technique est la moins douloureuse pour l'animal. Néanmoins, le prélèvement avec une pipette peut altérer la morphologie des cellules. La quantité des cellules prélevées peut être insuffisante. Il tend à minorer les comptages cellulaires, ce qui entraîne des pourcentages peu fiables et augmente les index (Evans et Savage 1970, Guyant 1988, Olson et al. 1984d).

2) Ecouvillonnage :

C'est la technique la plus couramment employée. On utilise un écouvillon stérile en coton à usage unique.

Précédemment certains écouvillonnages étaient effectués avec des « abaisses langue » coupés en quatre, polis et humidifiés avec du sérum physiologique (Christie, Bailey et Bell 1970). Ce matériel, outre son manque d'asepsie, rendait l'examen douloureux pour l'animal. On a également utilisés des spatules en métal (Evans et Savage 1970).

L'écouvillon stérile doit être humidifié avec du sérum physiologique stérile. Cela peut ne pas être nécessaire si la chienne présente des écoulements vaginaux suffisants (pendant le proestrus ou l'œstrus) (Johnston et al. 2001b). Néanmoins, lorsqu'on utilise du matériel non humidifié, le

coton collecte les cellules mais également du mucus, ce qui peut gêner l'étalement du prélèvement.

Les lèvres vulvaires peuvent être écartées manuellement avec le pouce et l'index.

L'écouvillon est introduit au niveau de la commissure dorsale de la vulve (cf. figures 11 et 12). Puis il est orienté crânio-dorsalement en direction de la colonne vertébrale. Une fois passée au dessus de l'arcade ischiatique, l'instrument est dirigé crânialement sur une quinzaine de centimètres (cf. figure 12). Au contact de la muqueuse du vestibule ou de la partie caudale du vagin, l'écouvillon subit une rotation. Le mouvement doit être imprimé avec une force suffisante pour assurer un bon contact avec la muqueuse vaginale. Puis l'écouvillon est extrait délicatement des voies génitales (Roszel 1977, Johnston 1988, Concannon et Digregorio 1987, Neveux 1999).

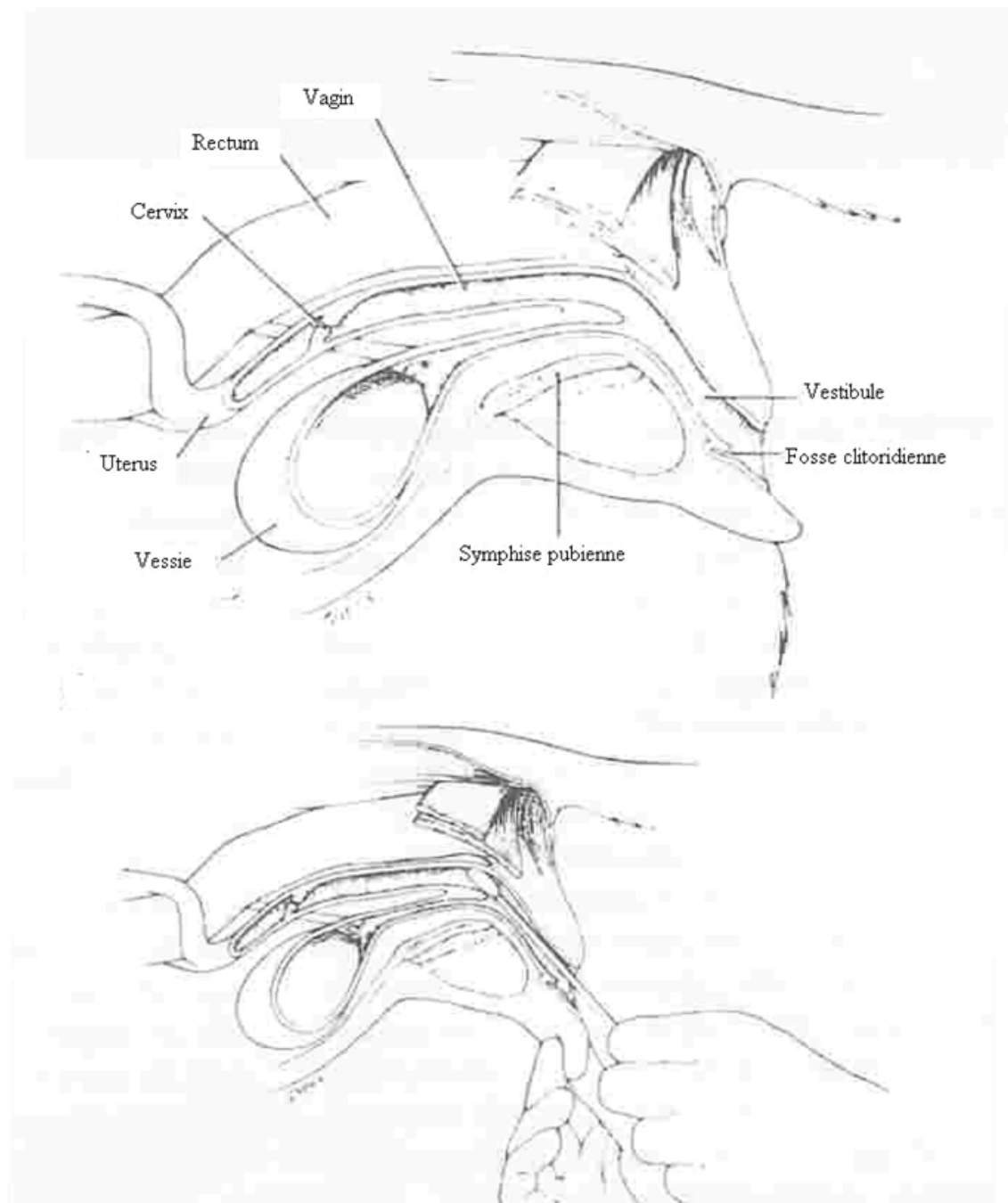


Figure 11 : Rappels anatomiques et technique de prélèvement
(Johnston et al. 2001b).



Figure 12 : Technique de prélèvement par écouvillonnage
(Bowen 2000).

Certaines précautions sont nécessaires pour éviter des erreurs.

- En dirigeant caudalement l'écouvillon, on évite d'effectuer un prélèvement dans la fosse clitoridienne. En effet, des cellules fusiformes kératinisées sont fréquemment prélevées dans cette zone et peuvent être confondues avec des cellules superficielles kératinisées observées lors de l'œstrus pour un œil non averti (Johnston et al. 2001b, Olson et al. 1984d).
- L'introduction sur 15 cm (pour une chienne de format moyen) est obligatoire. Les manipulations dans le vagin crânial peuvent être douloureusement ressenties par certaines femelles (Schutte 1967a). Au niveau de la zone caudale du vestibule, l'épithélium pourrait être moins sensible aux variations hormonales ; ceci a été montré chez la femme (Schutte 1967a), mais pas encore mis en évidence chez la chienne.
- Le prélèvement sur la partie dorsale du vestibule ou du vagin évite tout traumatisme du méat urétral (Johnston et al. 2001b).

Certains auteurs ont conseillé l'utilisation de spéculums (cf. figure 13). Ils évitent tout contact de l'écouvillon avec la muqueuse de la fosse clitoridienne et du vestibule caudal, ce qui assure de prélever dans la zone souhaitée. Il n'y a également aucun risque de léser le méat urinaire (Concannon et Digregorio 1987, Holst 1986, Mialot 1984b, Neveux 1999, Fayrer-Hosken 1996). Cependant ils sont rarement nécessaires en pratique courante.



Figure 13 : Technique de prélèvement à l'aide d'un spéculum
(Fayrer-Hosken 1996).

L'étalement sur une lame de microscope doit être effectué rapidement, afin d'éviter le dessèchement du prélèvement (Concannon et Digregorio 1987, Holst 1986). Le but est de transférer un matériel représentatif du prélèvement et non l'ensemble de ce dernier.

L'écouvillon est roulé sur une lame propre sans frottement pour ne pas détériorer les cellules (cf. figure 14) (Johnston et al. 2001b).

Généralement deux à trois lignes parallèles, bien séparées, peuvent être étalées sur toute la longueur d'une seule lame (Concannon et Digregorio 1987, Bowen 2000). Cependant, la superposition de deux étalements gênerait et fausserait la lecture du frottis. C'est pourquoi certains auteurs préconisent d'utiliser deux lames et de ne pratiquer qu'un seul étalement par lame (Mialot 1984b, Roszel 1975, Guyant 1988, Neveux 1999).

Il est préférable que l'étalement soit toujours réalisé par le même manipulateur qui applique le même appui de l'écouvillon sur la lame. En effet, les variations des différents types cellulaires sont parfois délicates à observer et nécessitent une méthode standardisée (Neveux 1999).

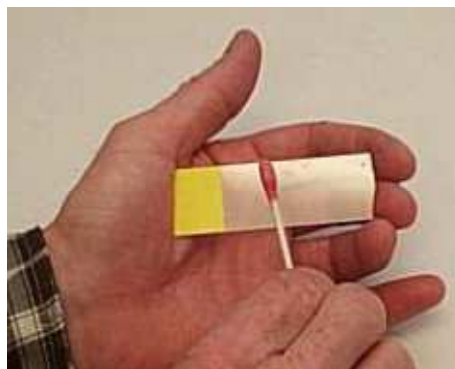


Figure 14 : Etalement d'un écouvillon sur une lame de microscope (Bowen 2000).

b) La fixation du prélèvement:

Le frottis doit être fixé immédiatement (dans les quelques secondes qui suivent l'étalement sur la lame), alors qu'il est encore humide. En effet, si l'air sèche les lames, les cellules peuvent se distordre (Neveux 1999, Concannon et Digregorio 1987, Roszel 1977).

La lame est plongée dans un bain de fixateur, qui peut être une solution de méthanol à 95% (Holst 1986, Olson et al. 1984d), un mélange à parts égales d'éthanol à 100° et d'éther (Schutte 1967a, Neveux 1999), ou des solutions industrielles préparées à cet effet.

Des cytofixateurs sont disponibles sous forme de spray. Cette technique peut être préférée du fait de son efficacité et de sa facilité d'utilisation et de conservation du fixateur (Concannon et Digregorio 1987, Johnston et al. 2001b, Neveux 1999).

c) Les différentes techniques de coloration :

Le praticien doit choisir une technique de coloration qui soit à la fois la plus simple à effectuer, se conservant bien, et qui doit éviter les erreurs de lecture en donnant des résultats constants (Feldman et Nelson 1996). Plusieurs techniques sont à notre disposition.

1) Les colorations uni-chromes :

➤ La coloration de May-Grunwald-Giemsa :

Cette technique et ses dérivés (Diff-Quick®) sont également couramment utilisés (Neveux 1999, Guyant 1988, Johnston et al. 2001b, Olson et al 1984a et b, Wright et Parry 1989, Concannon et Digregorio 1987) (cf. tableau 3). En effet de nombreux praticiens possèdent les réactifs dont ils se servent pour colorer les frottis sanguins.

Tableau n°3 : coloration Diff-Quick ® (Bowen 2000).

Ordre de passage	Produits	Temps
1	méthanol	10 passages
2	solution 1	10 passages
3	solution 2	10 passages

Les cellules vaginales, quel que soit leur degré de kératinisation apparaissent uniformément bleu-violet (cf. figure 17). Elles ne sont alors appréciables que par leurs seuls critères morphologiques (Neveux 1999, Johnston et al. 2001b, Concannon et Digregorio 1987, Wright et Parry 1989). Cette technique permet une très bonne visualisation des polynucléaires neutrophiles et des hématies (Neveux 1999) (cf. figure 15).

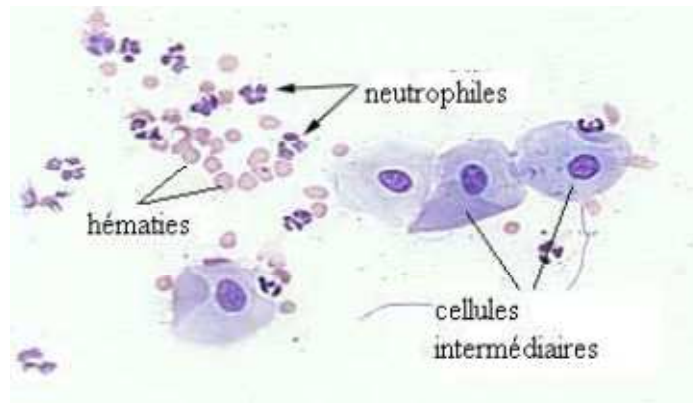


Figure 15 : Frottis vaginal de chienne coloré avec la méthode Diff-Quick ®
(Bowen 2000).

Les avantages de cette technique résident dans son faible coût et dans sa rapidité d'exécution (Concannon et Digregorio 1987, Olson et al. 1984 a et b).

➤ **Le bleu de méthylène :**

Le bleu de méthylène n'est presque plus utilisé à l'heure actuelle.

On pratique cette technique en plaçant une goutte de solution de colorant sur la lame, puis une lamelle est apposée.

C'est une coloration rapide et peu coûteuse, grâce à laquelle la visualisation de la morphologie cellulaire est bonne. Cependant elle ne permet pas la conservation des lames. En outre, elle ne met pas en évidence les affinités tinctoriales, et ne colore pas les hématies, ce qui rend parfois l'interprétation difficile (Guyant 1988, Neveux 1999, Johnston et al. 2001b, Olson et al. 1984a et b, Feldman et Nelson 1996, Simmons 1970).

2) **Les colorations plurichromes :**

➤ **La coloration de Harris Shorr :**

Il s'agit de la technique de coloration pratiquée au CERCA.

Cette coloration trichrome a été mise au point par Ephraïm Shorr en 1940 (Shorr 1940 a, b, 1941). Elle connaît de nombreuses variantes qui ont permis d'augmenter son efficacité et de faciliter sa mise en pratique (Guyant 1988, Oettlé et Weldhagen 1982, Roszel 1977, Neveux 1999, Schutte 1955c) (cf. tableau 4).

Tableau n°4 : Coloration de Harris – Shorr (Neveux 1999).

passage	Produits	Temps
1	mélange alcool-ether 1/2	5 minutes
2	alcool à 70°	plonger 10 fois
3	alcool à 50°	plonger 10 fois
4	eau distillée	plonger 10 fois
5	hématoxyline de Harris	2 minutes
6	eau distillée	passage
7	eau distillée	passage
8	alcool ammoniacal	1 minute
9	eau distillée	passage
10	alcool à 70°	passage
11	alcool à 95°	passage
12	colorant de Shorr	2 minutes
13	alcool à 95°	passage
14	alcool absolu	passage

L'intérêt de cette technique est la coloration orangée des précurseurs cytoplasmiques de la kératine (Olson et al. 1984 d). La lecture est aisée, car les cellules sont différenciées selon leur affinité tinctoriale. Les cellules basophiles apparaissent bleues, et les cellules acidophiles rouges orangées (Neveux 1999, Johnston et al. 2001b).

Dans le suivi du cycle sexuel chez la chienne, la coloration de Harris Shorr est la coloration de choix. Les cellules acidophiles deviennent rouge orange alors que la kératinisation progresse.

Les désavantages sont sa durée de mise en oeuvre (une quinzaine de minute), ce qui en fait l'une des techniques les plus longues ainsi que le grand nombre de récipients de produits mis à disposition (Feldman et Nelson 1996). Cependant, il existe comme alternative des kits simplifiés de coloration tels que le Diastron RAL ®.

➤ **La coloration de Papanicolaou :**

Cette coloration pentachrome a été décrite par Georges Papanicolaou en 1942 (Papanicolaou 1942). De même que le thrichrome de Harris Shorr, elle a subi de nombreuses modifications (Schutte 1967a) (cf. tableau 5).

Tableau n°5 : La coloration de Papanicolaou (d'après cours d'anatomie pathologique du CHU

Necker). (1) éosine, (2) mélange de vert lumière et de brun bismarck.

Ordre de passage	Produits	Temps
1	alcool à 70°	plonger 10 fois
2	alcool à 50°	plonger 10 fois
3	eau distillée	plonger 10 fois
4	hématoxyline de Harris	5 minutes
5	eau distillée	plonger 10 fois
6	alcool à 95°	passage
7	alcool à 80°	passage
8	alcool à 70°	passage
9	alcool à 70°	passage
10	Orange G 6 (1)	5 minutes
11	alcool à 95°	30 secondes
12	alcool à 95°	30secondes
13	EA 50 (2)	5 minutes
14	alcool à 95°	30 secondes
15	alcool à 95°	30 secondes
16	alcool absolu	30 secondes
17	xylène	2 passages

Les noyaux apparaissent bleu-violet, les cellules superficielles rose-orangé, les cellules intermédiaires bleu-vert, et les cellules plus profondes vertes plus franches (Papanicolaou 1942) (cf. figure 16).



(1) coloration verte du cytoplasme (cellule parabasale), (2) coloration bleutée du noyau

Figure 16 : Frottis vaginal pratiqué chez une femme et coloré avec la technique de Papanicolaou.
(Heron 2004 avec son autorisation).

Il s'agit de la coloration standard des frottis vaginaux chez la femme. Néanmoins nous ne l'avons jamais vu utilisée pour colorer les frottis vaginaux chez la chienne dans la littérature.

Le trichrome de Harris Shorr l'a supplanté pour effectuer une lecture tinctoriale des lames.

d) L'observation microscopique :

L'observation de la lame se fait en deux temps.

D'abord, un faible grossissement (x40 ou x100) permet d'apprécier globalement la richesse en cellules ainsi que leur répartition (dispersées, en amas ou isolées), la réussite de la coloration.

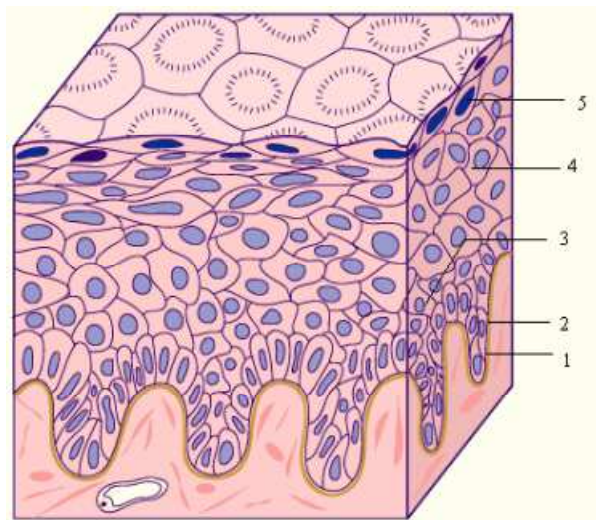
On peut déjà observer l'éventuelle présence de mucus, de polynucléaires neutrophiles, de spermatozoïdes. Cette première visualisation donne également la tendance tinctoriale du frottis (globalement basophile, acidophile, ou « mixte »).

Puis un fort grossissement (x400) nous donne des informations beaucoup plus précises sur les types cellulaires rencontrés. La morphologie et la couleur de la cellule, la taille et l'aspect du noyau sont des informations primordiales pour reconnaître le type cellulaire rencontré (Neveux 1999, Johnston et al. 2001b, Simmons 1970).

4.2. Les types cellulaires :

L'épithélium vaginal est de type stratifié pavimenteux non kératinisé ou épithélium malpighien (cf. figure 17). Une couche de cellules germinatives repose sur une lame basale.

Depuis cette couche vers la lumière utérine, on trouve successivement des cellules parabasales, des cellules intermédiaires (issues de la différenciation des cellules parabasales), puis des cellules superficielles (Schutte 1967a).



1 : lame basale, 2 : cellule germinative, 3 : cellule parabasale, 4 : cellule intermédiaire, 5 : cellule superficielle.

Figure 17 : Epithélium pavimenteux non kératinisé pluristratifié (D'après la division d'histologie du département de médecine de l'université de Fribourg).

Les différentes couches cellulaires présentent les trois stages de maturation physiologique : la prolifération, puis la différenciation et enfin l'exfoliation. Ce phénomène est sous la dépendance hormonale des estrogènes.

Lors de la lecture du frottis, on rencontre les différents types cellulaires de l'épithélium ainsi que des cellules présentes dans la lumière vaginale. Il convient donc de les classer avec soin.

a) Les cellules de l'épithélium vaginal :

Les affinités tinctoriales des cellules seront décrites en fonction de la coloration de Harris Shorr.

1) Les cellules parabasales :

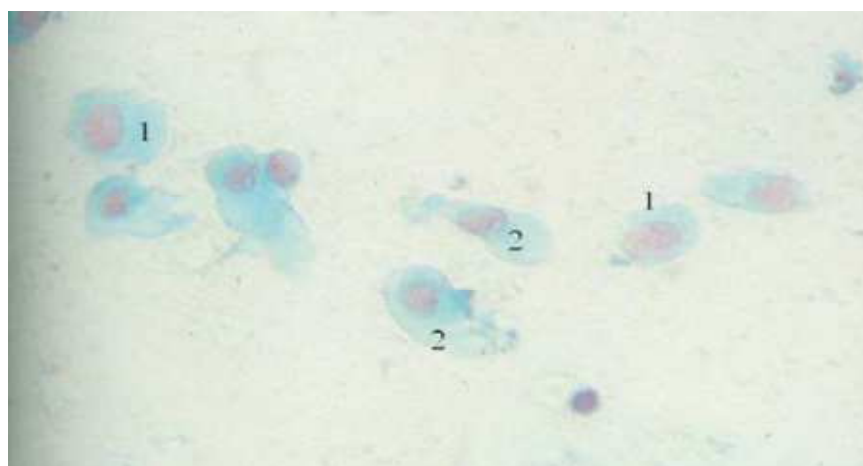
Ce sont les plus petites cellules épithéliales observées sur un frottis. Leur diamètre est de 10 à 20 μm (Concannon et Digregorio 1987, Johnston et al. 2001b). En effet, les cellules de la couche germinative ne sont que très rarement visualisées (Olson et al. 1984d, Johnston et al. 2001b).

Leur forme est généralement ronde et uniforme (Olson et al. 1984d, Schutte 1967a, Vaughan 1996). On peut néanmoins les observer en colonne (c'est-à-dire que le cytoplasme est étiré et que le noyau est excentré) (cf. figure 18) (Neveux 1999).

Leur noyau est rond et volumineux, et le cytoplasme peu abondant ; le rapport nucléocytoplasmique est donc élevé (Olson et al. 1984d, Guyant 1988, Johnston et al. 2001b, Feldman et Nelson 1996, Vaughan 1996).

Il fixe bien les colorants. Il peut certaines fois apparaître éosinophile (Concannon et Digregorio 1987).

L'ensemble de la cellule est basophile (bleuté) (Neveux 1999).



(1) : cellules parabasales rondes ; (2) cellules parabasales allongées.

Figure 18 : Cellules parabasales (d'après Mialot 1984 avec son autorisation).

2) Les cellules intermédiaires :

Ces cellules subissent la première étape qui conduit à la mort cellulaire. Il existe de très grandes variations de taille et de forme car elles représentent toutes les étapes de maturation entre l'état parabasal et l'état « superficiel » (Vaughan 1996). Ceci explique que deux sous-types ont été définis.

➤ Les petites cellules intermédiaires :

Ce sont les cellules en croissance. Elles assurent la transition entre les parabasales sphériques et les cellules plus larges, plus anguleuses qu'elles deviendront au fur et à mesure qu'elles s'éloigneront des couches les plus profondes (cf. figure 21) (Feldman et Nelson 1996, Concannon et Digregorio 1987).

Leur diamètre est supérieur à 20µm (Johnston et al. 2001b).

Leur forme varie de rond à anguleux. La plupart sont ellipsoïdes (Concannon et Digregorio 1987, Johnston et al. 2001b).

Le noyau est encore bien rond et bien visible. Son diamètre représente de 30 à 35 % de celui de la cellule (cf. figure 19 & 21) (Schutte 1967a, Concannon et Digregorio 1987).

La coloration cytoplasmique reste basophile. Le noyau peut commencer à prendre une légère teinte acidophile (cf. figure 19) (Concannon et Digregorio 1987).

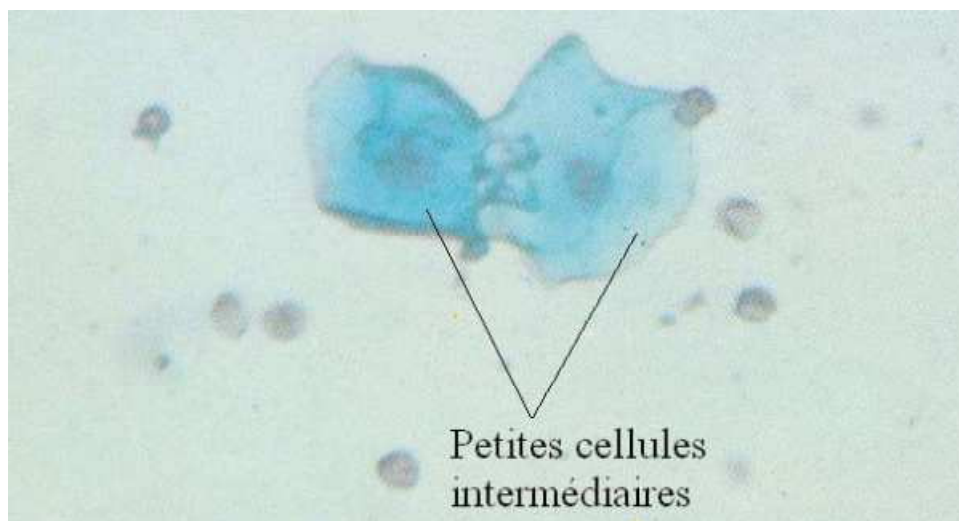


Figure 19 : Petites cellules intermédiaires
(Mialot 1984 avec son autorisation).

➤ **Les grandes cellules intermédiaires :**

Elles représentent l'étape intermédiaire entre les plus grandes des petites cellules intermédiaires, d'aspect globalement régulier, et les cellules superficielles, squameuses et irrégulières (cf. figures 21 & 22) Leur diamètre est supérieur à 30µm.

Elles sont plates. Leur contour est anguleux (cf. figures 21 & 22) (Johnston et al. 2001b, Concannon et Digregorio 1987).

Le noyau est de taille normale, visible et encore fonctionnel (Johnston et al. 2001b). En effet, elles représentent « la frontière » entre les couches cellulaires qui ont accès aux nutriments et celles trop éloignées de la lame basale pour pouvoir assurer une fonction nucléaire correcte.

Le diamètre nucléaire représente moins de 35%, et peut ne correspondre qu'à 15% du diamètre cellulaire (Concannon et Digregorio 1987).

Leur cytoplasme peut afficher soit une basophilie, soit une acidophilie (soit les deux). Le noyau, lui est toujours acidophile (cf. figure 27) (Concannon et Digregorio 1987).

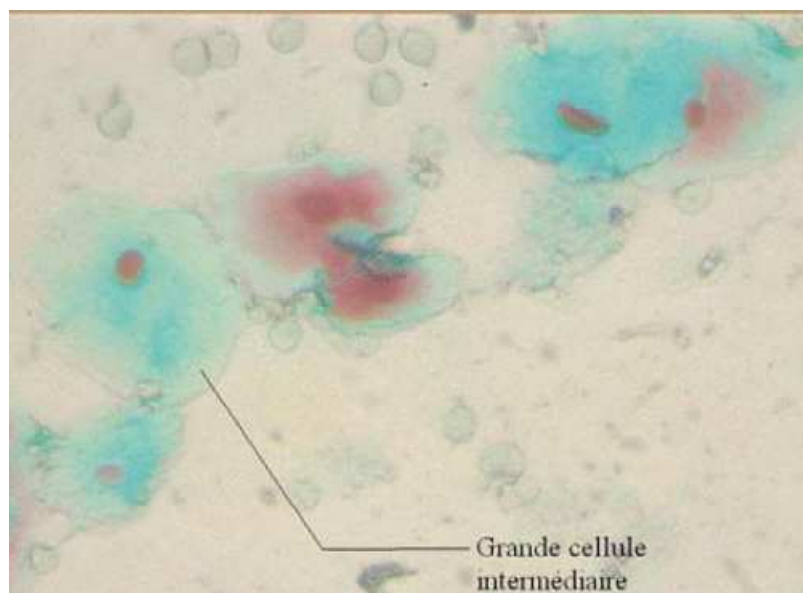


Figure 20 : Grande cellule intermédiaire (Mialot 1984 avec son autorisation).

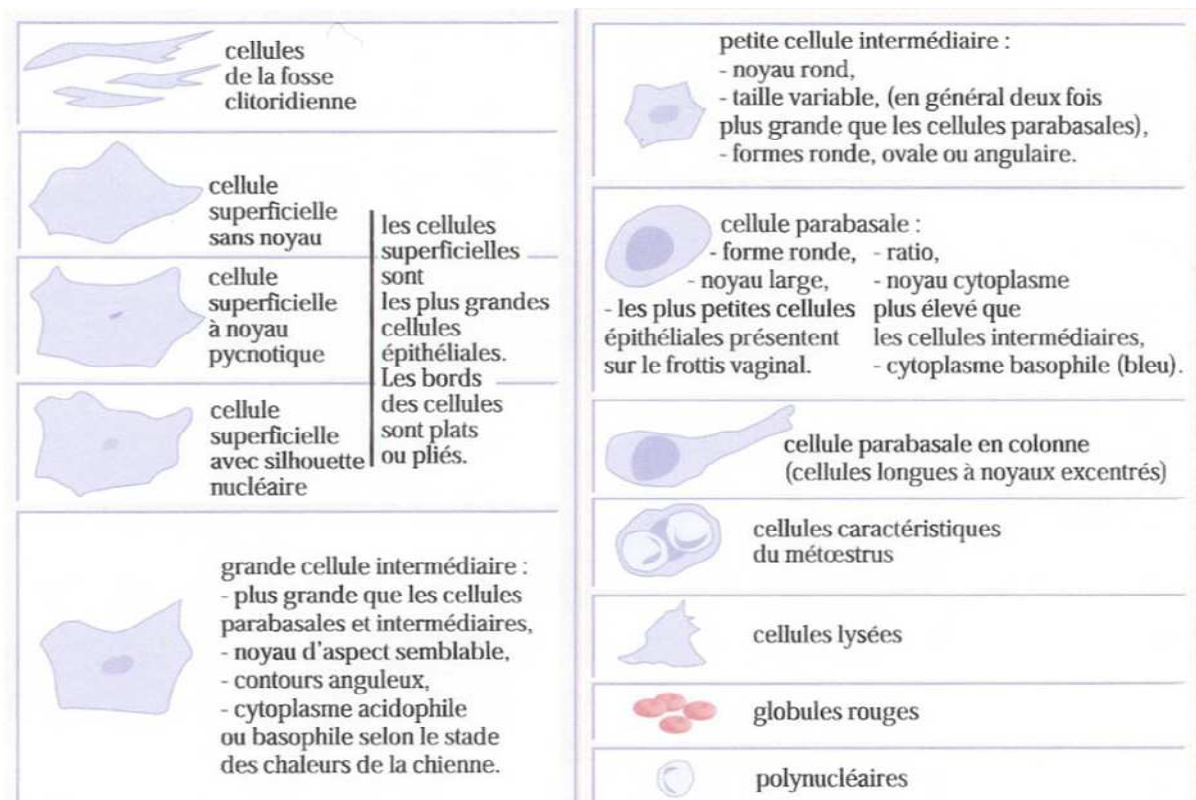


Figure 21 : Les cellules du frottis vaginal (Neveux 1999).

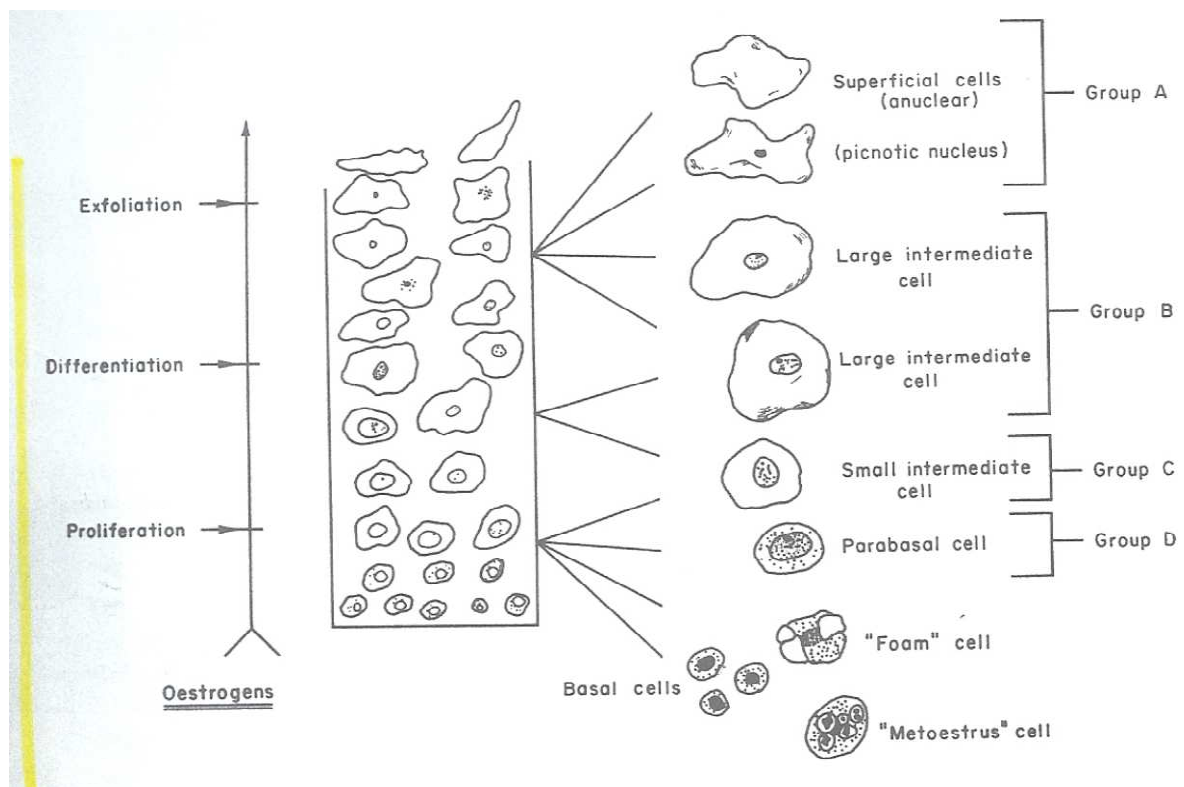


Figure 22 : Les cellules du frottis vaginal et leur processus de maturation (Schutte 1967b).

3) Les cellules superficielles :

Elles sont nommées ainsi en raison de leur position au sein de l'épithélium vaginal (cf. figure 22) (Johnston et al. 2001b).

Il s'agit des plus grandes des cellules vaginales ; leur diamètre est compris entre 30 et 75 μm (Johnston et al. 2001b, Vaughan 1996, Concannon et Digregorio 1987).

Les bords cellulaires sont irréguliers, anguleux et plissés. Elles peuvent présenter un aspect de « corn-flakes » (cf. figures 21 et 23) (Vaughan 1996).

Au contraire de ces dernières, le noyau est pycnotique, absent, ou on ne peut distinguer que sa silhouette (cf. figure 23) (Johnston et al. 2001b, Vaughan 1996, Concannon et Digregorio 1987, Schutte 1967a).

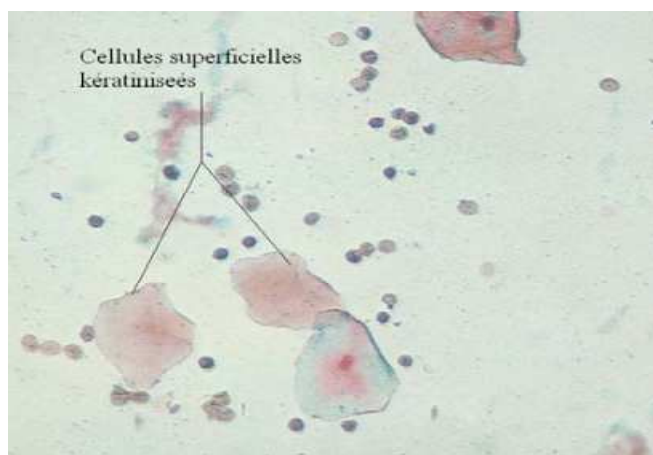


Figure 23 : Cellules superficielles kératinisées anucléées
(Mialot 1984 avec son autorisation).

Elles sont également appelées cellules kératinisées. En effet, le phénomène de kératinisation est lié à la dégénérescence qui transforme les cellules d'un épithélium malpighien en cellules mortes. Ceci est reflété par la pycnose nucléaire (Guyant 1988, Johnston et al. 2001b).

Les cellules ne possédant pas de noyau sont également appelées squames (cf. figures 21, 22 et 23) (Concannon et Digregorio 1987, Guyant 1988, Johnston, et al. 2001b).

La maturation peut s'arrêter au stade où les cellules superficielles présentent encore un noyau, même si le pic oestrogénique est atteint. Chez certaines chiennes, on a émis l'hypothèse que ce phénomène était associé à un refus de l'accouplement ou des problèmes de fertilité (Feldman et Nelson 1996).

L'ensemble de ces cellules est complètement acidophile. L'intensité de la coloration croît en fonction du stade de dégénérescence. Globalement plus la cellule est sénescence, plus l'acidophilie sera marquée (Johnston et al. 2001b). Néanmoins certaines squames ne prennent

absolument aucune coloration et apparaissent donc transparents. (Concannon et Digregorio 1987).

Ces cellules offrent une protection à l'épithélium vaginal lors de l'accouplement (Guyant 1988).

4) **Autres cellules issues de l'épithélium vaginal :**

➤ **Les cellules « metoestrales » :**

Il s'agit de cellules parabasales modifiées qui contiennent un ou plusieurs polynucléaires neutrophiles dans leur cytoplasme (Feldman et Nelson 1996, Johnston 1988, Neveux 1999, Johnston et al. 2001b, Olson et al 1984 d, Guyant 1988) (cf. figures 21, 22 et 24).

Elles reflètent la propriété de phagocytose de l'épithélium vaginal.

Comme leur nom l'indique, elles sont présentes lors de la phase lutéale du cycle sexuel.

Cependant elles peuvent être observées dès que des polynucléaires neutrophiles sont présents (En début de proestrus, ou en cas de vaginite) (Johnston et al. 2001b).

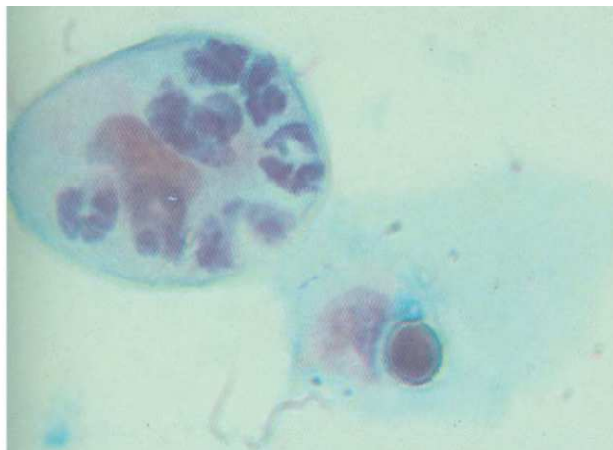


Figure 24 : Cellules metoestrales
(Mialot 1984 avec son autorisation).

➤ **Les cellules spumeuses ou « foam cells » :**

Ce sont des cellules parabasales ou intermédiaires qui contiennent des vacuoles cytoplasmiques (cf. figure 22). Leur origine et leur signification sont inconnues (Feldman et Nelson 1996, Olson et al 1984 d, Johnston et al. 2001b, Johnston 1988, Guyant 1988).

➤ **Les cellules superficielles avec des corps cytoplasmiques :**

Ces cellules sont fréquemment rencontrées chez des chiennes en œstrus. L'origine et le signification des inclusions cytoplasmiques est inconnue (Olson et al. 1984 c et d, Johnston et al. 2001b).

Les corps cytoplasmiques peuvent être aisément distingués des bactéries. Bien que les bactéries puissent adhérer aux cellules superficielles, elles sont plus petites et sont souvent observées en position extracellulaire (Johnston et al. 2001b).

➤ **Les cellules épithéliales contenant des grains de mélanine :**

Elles peuvent être observées sur des frottis issus de chiennes possédant un épithélium pigmenté (par exemple, les labradors noirs).

Elles ne doivent pas être confondues avec des cellules cancéreuses de mélanome. (Olson et al. 1984d, Johnston et al. 2001 b).

➤ **Les cellules néoplasiques :**

Les cellules anormales peuvent s'exfolier et donc être présentes au sein d'un frottis vaginal.

Les types tumoraux les plus fréquemment rencontrés lors d'un frottis sont : les carcinomes à cellules transitionnelles, les tumeurs vénériennes, les carcinomes à cellules squameuses, les métastases d'adénocarcinomes mammaires et les lymphosarcomes (Johnston et al. 2001 b, Guyant 1988).

b) Les autres cellules :

1) Les cellules sanguines :

➤ **Les érythrocytes :**

Ces cellules ont une double origine. Elles proviennent tout d'abord de l'utérus. Elles sont également issues du vagin, puisque des hématies ont été observées sur des frottis de chiennes en proœstrus qui avaient été auparavant hystérectomisées (Johnston, Olson et Kutritz 2001 b) (Holst 1986).

L'aspect de ces cellules est similaire à celui observé sur un frottis sanguin. Elles sont arrondies, ou avec des bords légèrement crénelés, semi transparentes.

Pendant l'œstrus, les hématies sont souvent plus difficiles à distinguer. Il n'en subsiste que des fragments cellulaires, ce qui semble suggérer une lyse cellulaire due à changement dans la composition du mucus vaginal (Concannon et Digregorio 1987).

➤ **Les leucocytes :**

Ils sont présents dans les frottis, sans que cela soit un signe pathologique.

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont les cellules issues de la lignée blanche qui sont le plus fréquemment observées. Les lymphocytes et les polynucléaires éosinophiles ne sont que très rarement rencontrés (Johnston et al. 2001b).

Les PNN sont généralement rencontrés lors du metestrus. En effet, lors de l'œstrus, l'épaississement de la muqueuse vaginale empêche toute diapédèse. Cependant, si des PNN sont observés sur un frottis provenant de chiennes en période d'œstrus, une métrite ou une vaginite doivent être envisagées. (Johnston et al. 2001b).

2) Les cellules de la fosse clitoridienne :

Les cellules de la fosse clitoridienne peuvent être observées si le prélèvement a été mal effectué ; c'est-à-dire dans la fosse clitoridienne au lieu du vestibule ou du plafond vaginal (figure 12).

Ces cellules totalement éosinophiles, très abondantes pendant l'anoestrus et l'œstrus, peuvent être confondues avec des cellules squameuses. Cependant, leur aspect fusiforme (cf. figure 21) ou un prélèvement non adéquat (frottis effectué à proximité de la vulve, ou algie de la chienne lors du prélèvement) doivent alerter le praticien (Johnston et al. 2001 b, Concannon et Digregorio 1987, Neveux 1999, Roszel 1977, Olson et al. 1984 c et d, Guyant 1988).

3) Les spermatozoïdes :

On peut les observer lorsque la chienne a été accouplée.

Bien que leur présence confirme un accouplement, leur absence n'élimine pas l'inverse. En effet dans une étude, seuls 65% des frottis obtenus 24 heures après un accouplement présentaient des spermatozoïdes (Johnston et al. 2001b).

4) Les bactéries :

Le vagin n'est pas une « chambre » stérile, et il est normal d'y observer différents types de bactéries. Leur quantité est très variable.

Si un grand nombre de micro-organismes est visualisé conjointement avec des PNN dégénérés, il peut s'agir d'un signe de vaginite (Holst 1986).

Les espèces bactériennes les plus fréquemment rencontrées sont : *Escherichia coli*, *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus canis*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus epidermitis*, *Corynebacterium spp.*, *Klebsiella aerobacter* et *Bacillus spp.* (Platt et Simpson 1974, Hirsch et Wiger 1977, Baba et al. 1983, Ling et Ruby 1978).

4.3. Les variations de la cytologie vaginale au cours du cycle œstral :

a) Le proestrus :

1) Le proestrus précoce:

Il s'agit d'un frottis pauci cellulaire (Johnston et al. 2001b).

On visualise des cellules parabasales, des petites et grandes cellules intermédiaires (Feldman et Nelson 1996) (cf. figures 25).

Les PNN et les bactéries sont présents en quantité variable (Feldman et Nelson 1996) (cf. Figure 31 et 32).

Le proestrus est communément déterminé par la présence en grand nombre d'érythrocytes (Feldman et Nelson 1996) (cf. figures 31).

Le fond du frottis est souvent granuleux ou « sale ». Ceci est dû au fait que les sécrétions muqueuses cervicales et vaginales fixent très bien la coloration (Feldman et Nelson 1996).

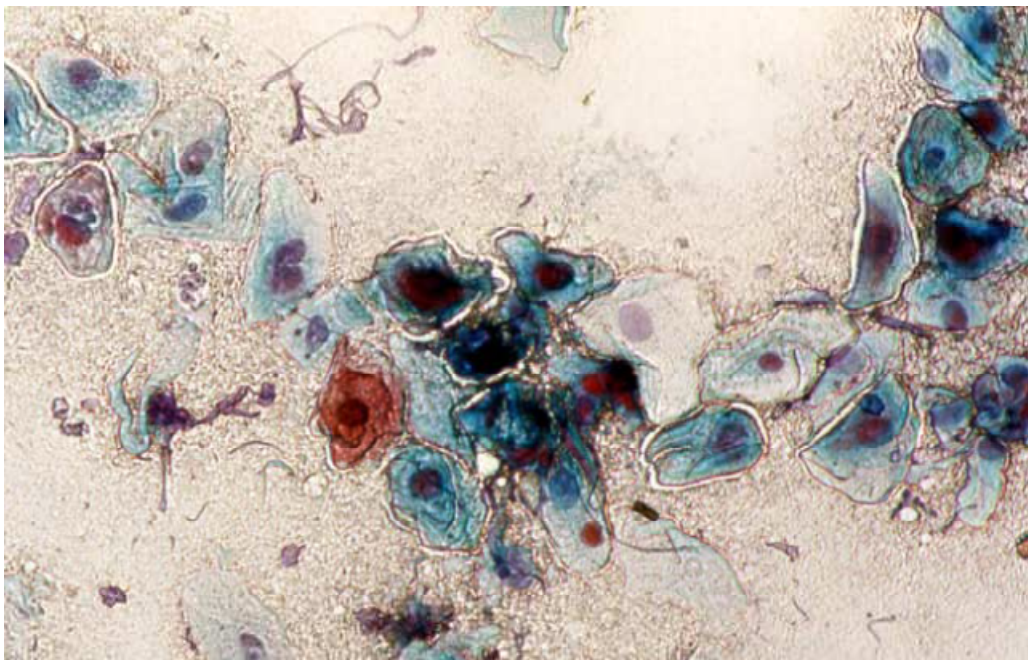


Figure 25 : Frottis de proestrus débutant
(cliché Alain Fontbonne).

2) Le proestrus moyen :

Les premiers effets de l'élévation sérique en estrogènes sur le tractus génital sont visualisés (Feldman et Nelson 1996).

Le frottis est riche en cellules.

La kératinisation cellulaire débute. La proportion en cellules parabasales et petites intermédiaires diminue progressivement, au profit de celle en cellules superficielles nucléées et anucléées (cf. figures 26, 29) (Feldman et Nelson 1996, Johnston et al. 2001b). La proportion en cellules parabasales par rapport au nombre total de cellules vaginales est de 5 à 30% en début de

proestrus ; elle passe à moins de 5% quatre à cinq jours avant le pic de LH (Johnston et al. 2001b).

Il y a une disparition des PNN. En effet l'épaississement brutal de la muqueuse vaginale empêche la diapédèse des neutrophiles. Ils ne seront plus visualisables jusqu'au metoestrus (Feldman et Nelson 1996) (cf. figures 29). La quantité d'hématie commence à décroître (Feldman et Nelson 1996, Johnston et al. 2001b).

Le fond du frottis est variable. Il peut être soit muqueux soit propre (Roszel 1977, Feldman et Nelson 1996).

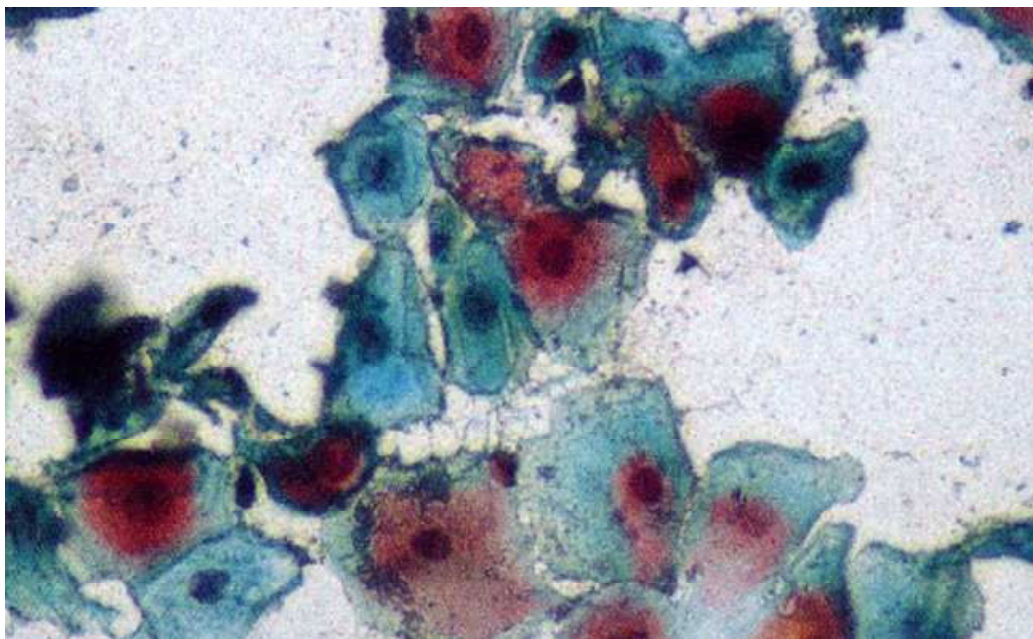


Figure 26 : Frottis de proestrus moyen
(cliché Alain Fontbonne).

3) Le proestrus tardif :

Le frottis est riche en cellules (Roszel 1977). Plus de 80% des cellules vaginales sont des cellules superficielles qui présentent un noyau vésiculaire, pycnotique, ou alors pas de noyau du tout (Feldman et Nelson 1996) (cf. figures 27, 29). Elles forment souvent de larges amas (Roszel 1977).

Le frottis vaginal ne contient plus de PNN (Feldman et Nelson 1996) (cf. figures 29).

La présence d'hématies est variable (Feldman et Nelson 1996) (cf. figure 29).

Le fond du frottis est propre (Roszel 1977). Il n'y a pas de différence majeure entre le proestrus tardif et l'oestrus. En effet les 1 à 8 derniers jours avant la fin proestrus sont typiques de

l'oestrus. Généralement durant 4 à 5 jours les deux phases ne peuvent être différenciées uniquement sur la base de la cytologie vaginale (Feldman et Nelson 1996).

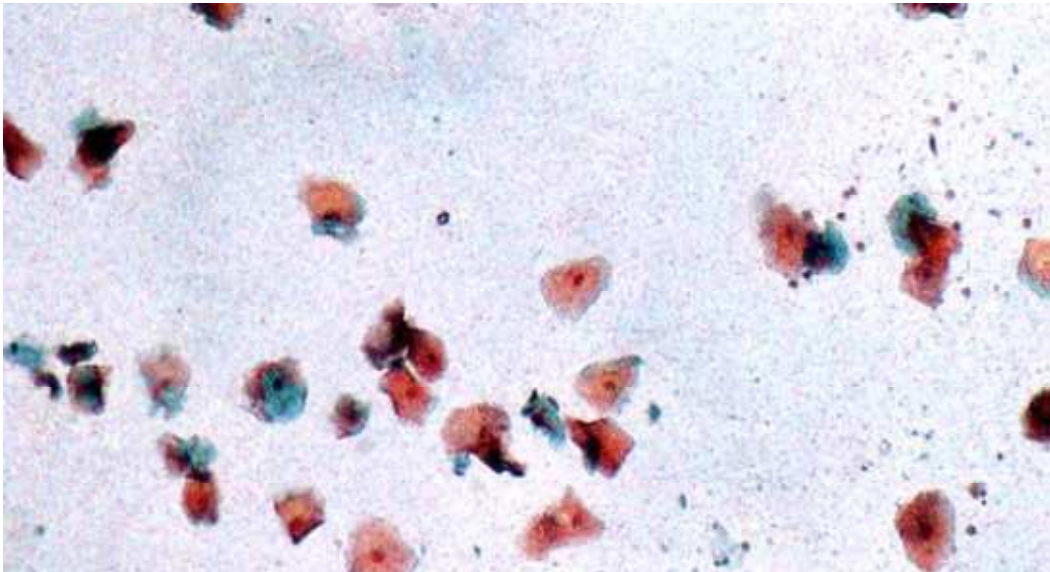


Figure 27 : Frottis de proestrus tardif
(cliché Alain Fontbonne).

b) L'oestrus :

Pendant toute cette phase et la période tardive de celle qui la précédait (10 à 14 jours), la cytologie vaginale demeure relativement constante (Holst 1986). Aucune donnée cytologique ne permet d'identifier avec certitude le jour du pic de LH, de l'ovulation ou de la fertilisation.

Par ailleurs, les frottis vaginaux sont considérés comme le miroir de l'oestrogénémie (Feldman et Nelson 1996). Pourtant en début d'oestrus, l'effet oestrogénique est maximal sur les frottis alors que la concentration sérique de ces stéroïdes commence à diminuer (Feldman et Nelson 1996).

Le frottis est riche en cellules. La kératinisation maximale survient de 5 à 6 jours avant jusqu'à 2 à 3 jours après le pic de LH et environ 2 jours après le pic d'estrogènes (Concannon 1986, Mestre et al. 1990).

Théoriquement à la survenue de l'oestrus (et pendant toute cette phase) et du pic de LH, le frottis vaginal est entièrement kératinisé et présente 100% de cellules anucléées (Feldman et Nelson 1996).

En pratique, un fait aussi simple et prévisible ne peut être constaté chez l'ensemble des chiennes. Généralement pendant l'œstrus, le pourcentage en cellules superficielles n'est jamais inférieur à 60% et est compris entre 80 et 100% (Feldman et Nelson 1996).

La kératinisation maximale peut être représentée par des « frottis-types » suivants :

- Environ 100% de cellules anuclées,
- Un pourcentage important de cellules kératinisées contenant un noyau dense et bien discernable,
- La présence parmi les cellules superficielles, de grandes cellules intermédiaires (Concannon et Digregorio 1987, Concannon 1986).

Cependant l'aspect tinctorial du frottis à cette période est très **acidophile** (cf. figure 28).

Le dernier jour précédant la survenue du metestrus, les cellules superficielles sont regroupées en amas, leur membrane cytoplasmique est difficilement discernable, la coloration cytoplasmique irrégulière et elles prennent un aspect flétri (Olson et al 1984 c et d, Concannon et Digregorio 1987, Holst et Phemister 1974).

Les PNN sont absents, très rares ou présentant des formes dégénératives (Olson et al. 1984 c et d, Feldman et Nelson 1996, Concannon et Digregorio 1987, Schutte 1967 b, Baker et Lumdsen 2001, Guyant 1988) ; ceci est dû à l'épaississement maximal de la muqueuse vaginale (Guyant 1988). Néanmoins il a été rapporté, qu'à la fin de l'oestrus (7.7 ± 3.1 jours après le pic de LH) des petits amas de leucocytes pouvaient être visualisés à nouveau sur les frottis (Bell et Christie 1971b, England 1992). Il s'agit du premier des effets visualisables du déclin de l'activité des estrogènes sur le vagin (Roszel 1977).

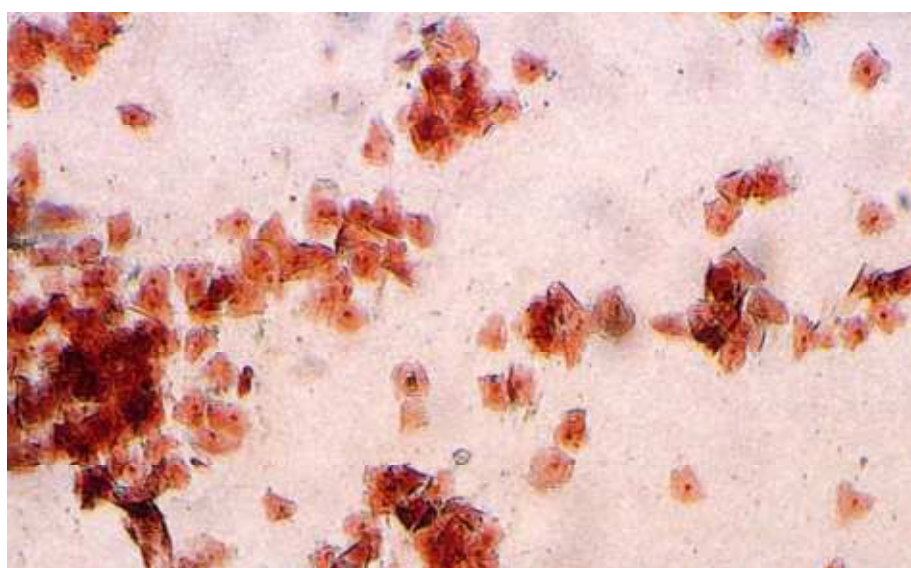


Figure 28 : Frottis d'œstrus (cliché Alain Fontbonne).

Le nombre de bactéries présentes sur le frottis est maximal durant cette phase (baba et al. 1983). Elles peuvent adhérer à la surface des cellules épithéliales superficielles.

En l'absence de neutrophiles, une quantité très importante en micro-organismes doit être considérée comme normale. (Johnston et al. 2001b).

La quantité d'érythrocytes varie en fonction des individus (cf. figures 29). Elle peut être de très abondante à très faible et cela malgré des écoulements vulvaires toujours présents. Les modifications du mucus vaginal pourraient provoquer leur lyse. Leur absence est constatée chez certaines femelles. (Concannon et Digregorio 1987).

Cependant la plupart des chiennes présentent encore des cellules sanguines sur leurs frottis (Bell et Christie 1971b).

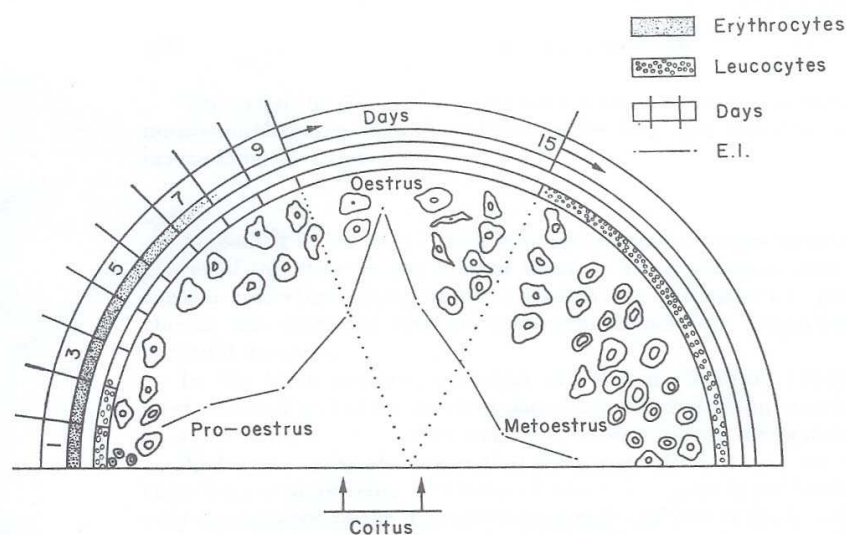


Figure 29: Représentation schématique de la cytologie vaginale rencontrée lors du proestrus, de l'oestrus et du metoestrus (Schutte 1967b).

Durant toute cette période, le fond du frottis est propre (Feldman et Nelson 1996, Wright et Parry 1989, Concannon et Digregorio 1987, Johnston et al. 2001b, Olson et al. 1984c&d, Schutte 1967c, Roszel 1977).

La cytologie vaginale est donc bien une méthode imprécise pour apprécier le premier jour de l'oestrus. Cependant c'est un moyen indirect mais satisfaisant pour estimer la concentration plasmatique en estrogènes. Les effets marqués de cette classe de stéroïdes sur la muqueuse vaginale persistent malgré leur retour à des valeurs basales au début du metoestrus.

c) Le metoestrus :

1) Le metoestrus précoce :

Cette phase du cycle est marquée, dès son premier jour, par des changements cytologiques brutaux qui sont corrélés avec le retour, un à deux jours auparavant, de la concentration en estrogènes à des valeurs basales (Holst et Phemister 1974, Concannon et Digregorio 1987, Feldman et Nelson 1996, Johnston et al. 2001b).

Le frottis est riche en cellules (Feldman et Nelson 1996).

La survenue du metoestrus cytologique correspond au jour où le pourcentage en cellules kératinisées diminue d'au moins 20%. Le premier jour cette chute est souvent supérieure à 50%. De façon corollaire, le nombre de cellules des couches profondes de l'épithélium augmente et représentent au moins plus de 10 % (et souvent plus de 50%) des cellules du frottis (Holst et Phemister 1974). A cet instant l'aspect des cellules superficielles se modifie : elles apparaissent pliées, leur contour s'estompant (Holst et Phemister 1974).

En trois jours, la proportion des cellules parabasales et des petites cellules intermédiaires peut représenter jusqu'à 95% des cellules épithéliales (Feldman et Nelson 1996, Concannon et Digregorio 1987). Dans une étude, les petites cellules vaginales (parabasales et petites intermédiaires) représentaient 63.8 ± 12.5 % et les grandes cellules intermédiaires ainsi que les superficielles 36.7 ± 12.8 % (Dore 1978). On observe simultanément une augmentation du nombre des grandes cellules intermédiaires, dans le cas où ces dernières auraient été rares ou absentes pendant l'oestrus (Concannon et Digregorio 1987) (cf. figures 29).

La coloration est à **prédominance basophile**.

Occasionnellement des cellules spumeuses et/ou des cellules metoestrales sont visualisées. Elles pourraient être un bon moyen pour « dater » un frottis ; malheureusement il en a été observé à d'autres phases du cycle (Feldman et Nelson 1996).

Les leucocytes réapparaissent en nombre variable au moment de la modification des types cellulaires du frottis (cf. figures 29). Moins fréquemment ils sont observés dans les 3 premiers jours du metestrus (Holst et Phemister 1974). Chez les individus pour lesquels ces cellules étaient déjà présentes en fin d'oestrus, leur quantité est plus importante (Dore 1978).

Néanmoins en début de metoestrus (du 3ème au 5ème jour), un pic de leucocytes est observé (Bell et Christie 1971b).

Des bactéries sont toujours présentes, mais en quantité moins importante que lors de l'oestrus (Baba et al. 1983). Cependant, aucune étude n'a étudié la variation du nombre de micro-organismes pendant le metoestrus.

Les hématies sont encore visualisables durant les 18 premiers jours du metoestrus (Olson et al. 1984 c&d, Johnston et al. 2001b, Neveux 1999) Dans une étude, 33% des chiennes présentaient

encore un grand nombre de ces cellules (de 10 par champs microscopique à une telle quantité que les autres cellules sont masquées) (Bell et Christie 1971).

Le fond du frottis est sale, contenant de grands amas de débris cellulaires (Neveux 1999, Feldman et Nelson 1996) (cf. figure 30).

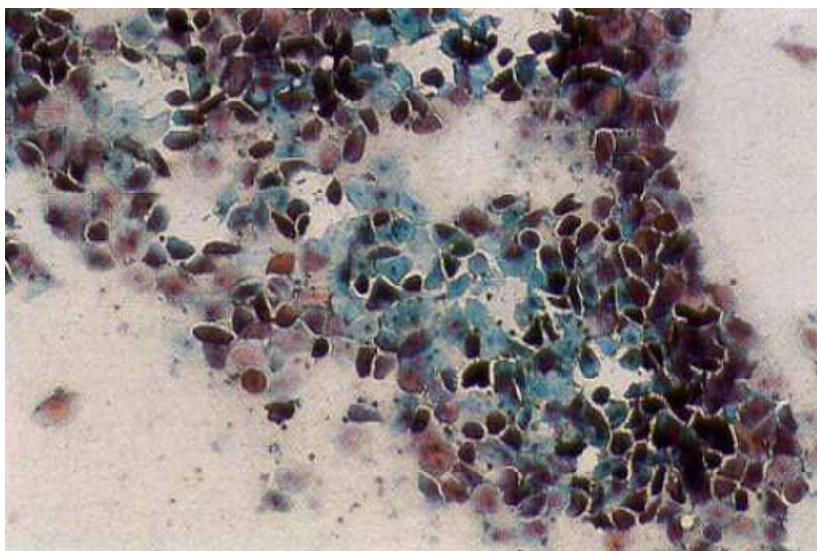


Figure 30 : Frottis de début de metoestrus
(cliché Alain Fontbonne).

2) Le metoestrus moyen et tardif :

A la suite des modifications majeures intervenues lors des premiers jours, la cytologie vaginale ressemble à celle de l'anoestrus (Feldman et Nelson 1996, Johnston et al. 2001b).

Les petites cellules vaginales (parabasales et petites intermédiaires) sont prédominantes. Dans l'étude de M.A. Dore, elles représentent $83 \pm 11\%$ des cellules contre $16.7 \pm 11.8\%$ pour les grandes cellules intermédiaires et les cellules superficielles (Dore 1978). Les cellules parabasales apparaissent cuboïdales et en colonne (Dore 1978) (cf. figure 31).

Le frottis est **basophile**.

Après le pic de leucocytes précédemment observés, ces cellules continuent à être présentes, mais il a été remarqué qu'entre les jours 19 et 60 du metoestrus leur quantité diminuait (Bell et Christie 1971b).

Durant le reste du metoestrus, la présence des érythrocytes est rare et aléatoire. Dans l'étude de Bell et Christie, pendant les 30 derniers jours du metestrus, des hématies n'étaient visualisées que sur 4 des 62 frottis réalisés, et en quantité « négligeable » (cellule isolée à 2 à 3 cellules par champ microscopique) (Bell et Christie 1971).

Le fond du frottis tend à devenir propre (Feldman et Nelson 1996).

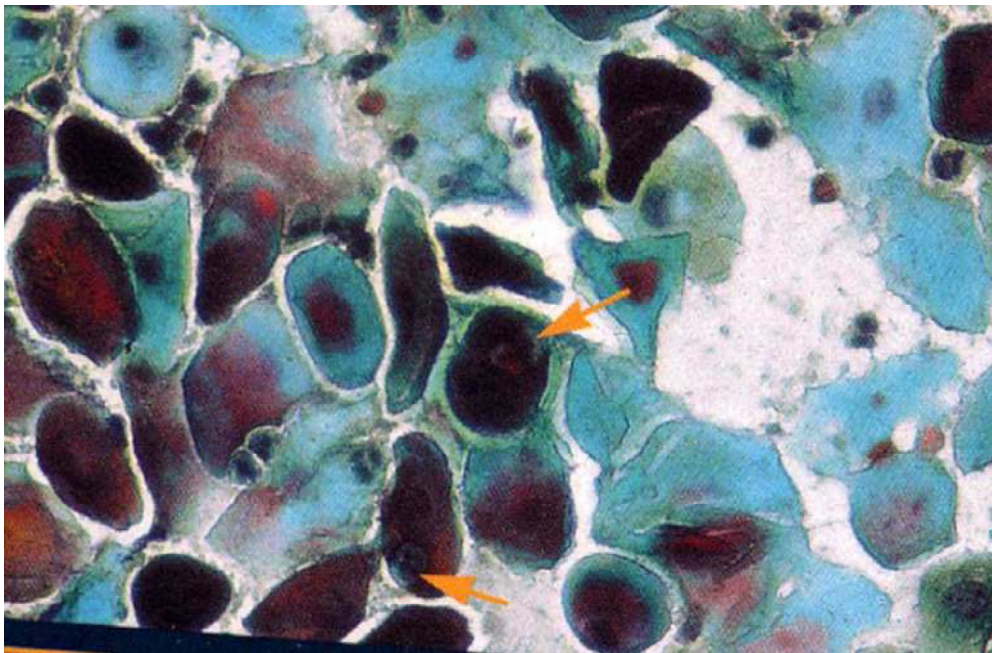


Figure 31 : Frottis de metoestrus
(cliché Alain Fontbonne).

d) L'anoestrus :

Il s'agit d'un frottis paucicellulaire (Neveux 1999, Concannon et Digregorio 1987, Post 1985).

Les cellules parabasales et petites intermédiaires sont prédominantes (cf. figures 32). D'après l'étude de M.A. Dore, elles représentent 87.0 ± 7.4 % des cellules (Dore 1978). Les cellules intermédiaires présentent des granules cytoplasmiques (Roszel 1977).

Les cellules adhèrent à des amas ou des traînées de mucus (Concannon et Digregorio 1987) (cf. figure 32).

Les cellules superficielles, pliées, et les squames proviennent du cycle précédent (Concannon et Digregorio 1987).

Le frottis est **basophile** mais est très peu marqué tinctorialement (Concannon et Digregorio 1987).

Pendant l'anoestrus, la quantité de leucocytes est très variable entre les individus. Cependant la plupart des frottis présentent des PNN isolés (Bell et Christie 1971b).

Les bactéries sont présentes (Olson et al. 1984 d, Johnston et al. 2001b, Guyant 1988), mais en quantité bien inférieure aux autres phases du cycle (Baba et al. 1982).

Les érythrocytes sont absents (Christie et Bell 1971b).

Le fond du frottis est sale (Neveux 1999, Feldman et Nelson 1996).

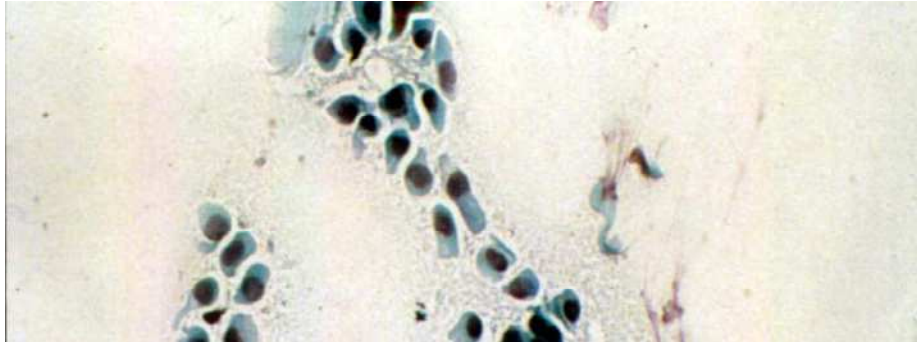


Figure 32 : Frottis d'anoestrus
(cliché Alain Fontbonne).

e) La transition anoestrus-proestrus :

Quinze jours avant le début du proestrus, le frottis jusqu'alors paucicellulaire, voit la quantité de cellules augmenter. Ce sont les cellules intermédiaires (grandes et petites) qui voient leur nombre croître (Concannon et Digregorio 1987, Dore 1978).

A la même période, des hématies sont à nouveau visualisables (Christie et Bell 1971b).

5. Diagnostic et suivi de la gestation

Il n'y a pas de signes cliniques précoces de gestation. Aucun diagnostic clinique n'est possible avant 19 à 21 jours après la fécondation. Certains examens permettent un diagnostic précis de la gestation, d'autres servent seulement d'indices. (Figure 39) Il existe trois méthodes de diagnostic assez précoces : la palpation, l'échographie et le dosage de la relaxine, et une méthode plus tardive: la radiographie.

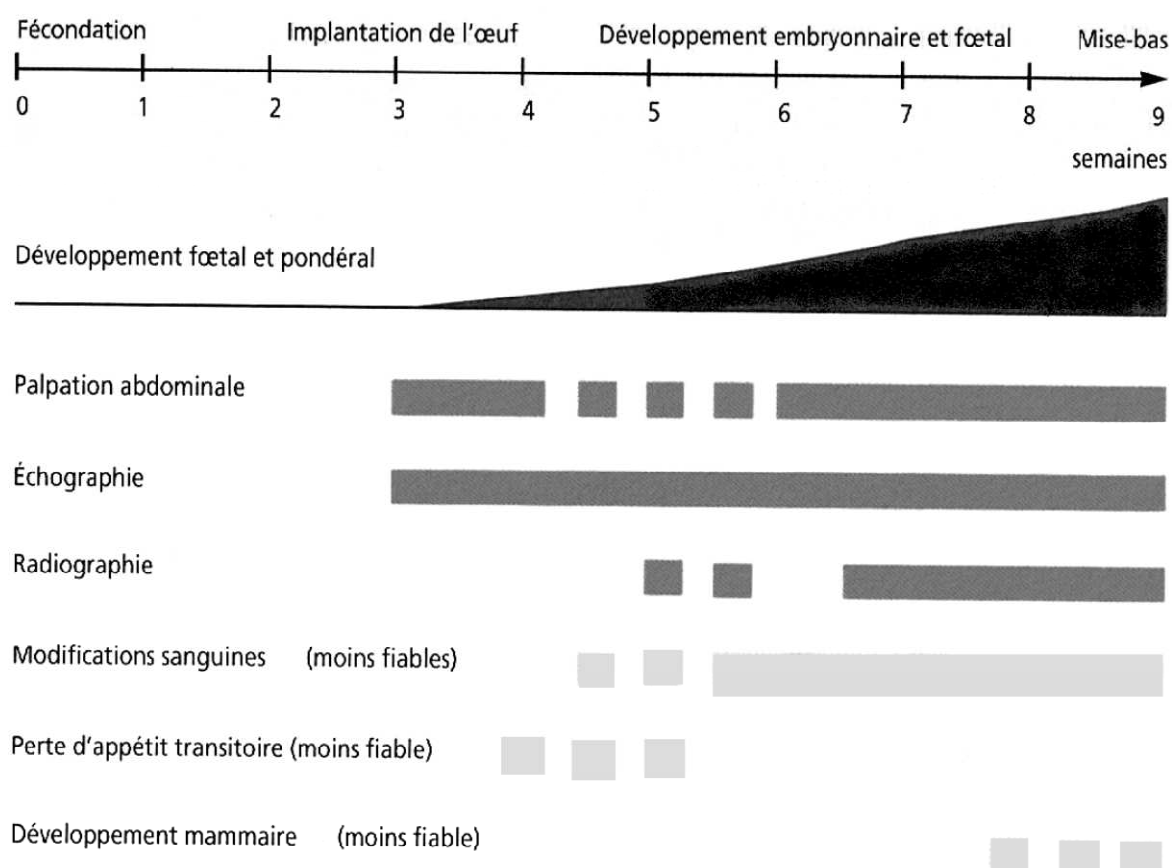


Figure 33 : Diagnostic de gestation chez la chienne

5.1. Anamnèse

• Modifications comportementales :

La chienne peut devenir « collante » ou distante.

Une semaine avant la mise bas, la chienne « gratte le sol » avec ses antérieurs, ceci est en rapport avec la reprise de l'activité contractile de l'utérus.

• Modifications d'appétit :

Une anorexie ou une hyporexie transitoire de quelques jours peut être constatée vers le 28^{ième} jour. (Concannon PW, Verstegen J, 2004) Ce signe peut être favorable mais n'est pas présent chez toutes les chiennes. (fontobonne A, 2003) Une augmentation moyenne de 40% de la prise alimentaire peut être observée après 5 semaines. (Concannon PW, 2005, fontobonne A, 2003)

- Prise de poids :

La prise de poids varie de 20 à 55% (Concannon PW, 2005) avec une moyenne de 35% (fontobonne A, 2003).

5.2. Examen clinique

_ Inspection : (fontobonne A, 2003)

- Élargissement de l'abdomen: 4^{ème} semaine

Il s'accompagne d'une ptose abdominale lors du deuxième mois, en cas de portée nombreuse.

- Développement mammaire: dès 25 à 30 jours

Les mamelles sont dures, turgescents et congestionnées. Le cordon mammaire est bien visible. Mais ce critère n'est pas fiable. (fontobonne A, 2003)

- Apparition de la lactation : de 40 jours à la mise bas

Ce critère n'est pas fiable non plus car il est trop variable.

- Écoulements vulvaires séreux et/ou blanchâtres peu abondants peuvent apparaître, pendant 1 ou 2 jours, vers 25-30 jours : ils sont rares mais lorsqu'ils existent, sont quasi pathognomoniques d'une gestation.

_ Palpation :

- De 21 à 35 jours :

La palpation permet un diagnostic plutôt fiable avec moins de 10% d'erreur possible. (FONTBONNE A, 2003) Elle est à réaliser avec la plus grande souplesse possible car elle peut être à l'origine de résorption fœtale si elle est effectuée trop fréquemment et sans douceur. Les embryons forment une série d'ampoules ovales d'environ 1cm de diamètre dans l'utérus gravide, les plus caudales pouvant être palpées à travers la paroi abdominale vers le 22^{ème} jour environ. La palpation peut permettre un diagnostic de gestation plus précoce que l'échographie mais avec moins de certitude. (Concannon PW, 2005) Entre le 30^{ième} et le 34^{ième} jour, des ampoules de 2,5 sur 3,5 cm permettent un diagnostic plus fiable. (Concannon PW, 2005)

- Après 35 jours :

La palpation ne permet plus de mettre en évidence les ampoules fœtales car elles augmentent de taille, puis confluent, et ne sont plus individualisables.

- A partir de 45 jours :

La palpation des reliefs osseux permet à nouveau de mettre en évidence les fœtus.

- **Limites :**

Des difficultés sont rencontrées à la palpation, chez les chiennes grasses, tendues, ou à abdomen musclé, des myorelaxants peuvent alors être utilisés. Lors de gestation où un seul fœtus existe, situé très crânialement, il est difficile de détecter celui-ci à la palpation.

- _ **Auscultation :**

En fin de gestation, les fœtus ont une fréquence cardiaque de 220 à 240 battements par minute. Avant, il est difficile de les détecter. L'auscultation est surtout intéressante au moment de la mise bas, lors d'un post-terme par exemple, afin de déterminer si les fœtus sont encore vivants. Elle s'effectue en posant la capsule du stéthoscope sur l'ombilic.

5.3. Examens complémentaires

a) Les analyses sanguines

1) Paramètres Hématologiques

La chienne présente une anémie normocytaire normochromique physiologique principalement en raison de l'augmentation du volume plasmatique. Cela facilite la circulation sanguine dans les vaisseaux placentaux.

L'hématocrite commence à chuter à partir du 25^{ième} jour après le pic de LH, il est inférieur à 40% en fin de gestation et peut atteindre une valeur de 31% au terme. L'hématocrite redevient normal dans un intervalle de 1,5 à 3 mois après la mise bas. (Concannon PW, 2005) Une thrombocytopénie peut être associée à cette anémie physiologique.

2) Paramètres biochimiques

- **L'albumine**

La chienne peut présenter une hypoalbuminémie.

- **Protéines totales**

Leur concentration peut également être diminuée, ce qui provoque une baisse de la pression oncotique.

- **Le calcium total**

Ce paramètre peut être diminué.

- **Les protéines de l'inflammation**

De nombreuses protéines de l'inflammation tels que la protéine C-réactive, l'haptoglobine, l'acide glycoprotéique, la céruloplasmine et le fibrinogène ont un taux qui augmente dès le début

de la placentation. Cela est dû à la réaction inflammatoire qui survient au niveau de l'endomètre lorsque celui-ci est érodé par le trophoblaste. (Romagnoli S 2006)

_ Le fibrinogène est produit par le foie, son taux normal varie entre 100 et 150 mg/dl. Chez la chienne gestante, le taux monte à des valeurs se situant entre 250 et 300 mg/dl autour du 25-28ième jour après l'ovulation. Une valeur de 300 mg/dl au 28ième jour est considérée comme apportant 100% de précision dans un diagnostic de gestation. (Romagnoli S 2006)

_ L'haptoglobine et la céruloplasmine sont liées respectivement au fer et à l'hémoglobine. Le taux normal en haptoglobine est de 35-50 mg/dl, chez la femelle gestante il est de 75-100 mg/dl vers le 18-20ième jour après l'ovulation. (Romagnoli S 2006)

Chez une femelle en bonne santé, l'augmentation des concentrations des facteurs de l'inflammation est un indicateur indirect de l'implantation et peut être utilisé en pratique dans le diagnostic de gestation. Bien sûr, il est nécessaire de faire un bilan sanguin avant la mise à la reproduction pour connaître les valeurs de départ.

b) Les dosages hormonaux

• Relaxine :

Le dosage de la relaxine à l'aide des kits de dosage Reprocheck © ELISA (dosage quantitatif) ou Witness Relaxin © (immuno-migration qualitative) (Synbiotics), est une méthode fiable et précise. Le test ELISA peut être positif à partir de 20-23 jours et le test WITNESS à partir de 26-30 jours. (Concannon PW, Verstegne J, 2004) En effet, le placenta débute la sécrétion de l'hormone entre le 24ième et le 28ième jour suivant la décharge ovulante, jusqu'au part. Son taux atteint un maximum de 4 à 6 ng/ml, 2 à 3 semaines avant la mise bas, et reste élevé jusqu'au part. (Romagnoli S 2006) La concentration de cette hormone peut varier suivant les races, ainsi une chienne Labrador aura un taux plus élevé que celui d'une chienne Beagle. L'intensité du signal est également dépendante de la taille de la portée. Plus cette dernière est importante plus le signal sera élevé. (Concannon PW, 2005) le test est plus fiable et donne moins de faux négatifs après le 30ième jour. (Fontobonne A, 2003), la fiabilité est optimale après 25 jours. Si le résultat du test est négatif il faut le refaire une semaine plus tard.

• Prolactine :

Le taux de cette hormone augmente à partir du 25ième jour après le pic de LH (Romagnoli S 2006) et à partir du 30ième jour (Concannon PW, Verstegen J, 2004), jusqu'à la lactation. Chez la femelle non gestante son taux est faible (< 2ng/ml) lors de la deuxième moitié du dioestrus alors que chez la chienne gestante sa concentration augmente lors de la dernière semaine de gestation à une valeur d'environ 40 ng/ml puis à environ 100 ng/ml 1 à 2 jours avant la mise bas.

Le pic de prolactine est supérieur à 100 ng/ml et il a lieu 1 à 2 jours après la parturition. La prolactine induit le développement mammaire et à la lactogenèse lors des 30 derniers jours de gestation alors que la progestérone inhibe la lactation. La chute de la progestéronémie au moment de la mise bas, et la montée de la prolactinémie, provoque la synthèse et la sécrétion de lait. (Concannon PW, Verstegen J, 2004)

- Progestérone :

Comme nous l'avons vu précédemment, le dosage de la progestérone est utilisé dans la détermination de la date d'ovulation. Il ne peut être utilisé pour diagnostiquer une gestation car la progestéronémie d'une chienne gestante est similaire à celle d'une non gestante. Cependant, lors du suivi de la gestation, cette hormone peut être dosée afin de vérifier qu'il n'y a pas d'insuffisance lutéale. En effet, si la progestéronémie est inférieure à 4-5ng/ml avant le 55ième jour cela peut provoquer l'avortement puisque la progestérone est la seule hormone nécessaire au maintien de la gestation. (Concannon PW, 2005)

- Œstrogènes :

Leur concentration est très variable et leur dosage ne procure aucune information utile. (Concannon PW, 2005)

c) L'imagerie médicale

1) La radiographie

Dès 30 jours, il est possible d'observer une augmentation du diamètre utérin, l'utérus repousse les anses digestives vers l'avant. Mais cela n'est pas significatif et peut être observé lors de pyomètre.

2) L'échographie

Théoriquement, le diagnostic de gestation est possible dès 15 à 19 jours. (FONTBONNE A, 2003) En pratique, il se fait dès le 20ième jour, mais il faut souvent attendre le 25ième jour pour avoir une certitude de 100%. C'est à ce moment que la détection des battements cardiaques des embryons est possible. Le diagnostic de gestation dépendrait en fait des races, et serait plus tardif chez les grands chiens : le diagnostic de gestation de certitude par échographie est à 35 jours chez les races de type Terre Neuve. (TAINTURIER D., CHOQUART V., FIENI F. et al. 1998)

L'échographie est le diagnostic de gestation le plus précoce et le plus fiable (fontobonne A, 2005). Cet examen permet également de :

- Dater la gestation :

La datation de la gestation est très peu utilisée en pratique. Il existe des tables de références pour quelques races comme le Labrador ou le Beagle.

- Déterminer le sexe des fœtus :

Le sexage des fœtus est possible en fin de gestation mais ce n'est pas applicable en pratique.

- S'assurer du bon déroulement du développement embryonnaire :

Le rythme cardiaque des fœtus est un bon indicateur de souffrance fœtale, il doit être supérieur à 220 BPM (battements par minutes), avec une moyenne de 230 BPM. La fréquence cardiaque des fœtus peut être mesurée à partir du 28ième jour de gestation. (Concannon PW, 2005)

- Dénombrer les ampoules :

Le dénombrement est possible entre J25 et J30 mais c'est aussi le stade des résorptions embryonnaires, il est donc préférable de le faire entre le 30ième et le 40ième jour. Après 40 jours, les ampoules fœtales sont convergentes, il devient alors difficiles de les compter. La prévision de la taille de la portée est plutôt fiable lorsqu'elle ne dépasse pas 4 chiots. Sinon il est préférable d'annoncer au propriétaire que la chienne attend 5 chiots ou plus, ou 4 chiots au maximum. (TAINTURIER D., CHOQUART V., FIENI F. et al. 1998)

- Détecter des malformations : Ceci n'est pas encore fait en pratique.

6. PROTOCOLES D'INDUCTION DES CHALEURS CHEZ LA CHIENNE

Différents protocoles thérapeutiques sont proposés dans la littérature : le principe est de stimuler la folliculogénèse puis l'ovulation. L'intervention ne peut se faire qu'en anoestrus tardif car pendant le metoestrus, le corps jaune inhibe l'axe hypothalamo-hypophysaire.

6.1. Protocoles utilisant des anti-prolactines

L'utilisation de substances dopaminergiques est recommandée en première intention lors d'anoestrus pathologique (>7mois d'interoestrus) : c'est l'effet dopaminergique central qui semble agir favorablement lors de cet effet inducteur de chaleurs. (Edwards RG, Howles CM, Macnamee MC, 1990). cabergoline (GALASTOP®): 5µg/kg/jour pendant trois semaines. On obtient 70% de chaleurs induites dans le mois suivant le début du traitement, et un taux de fertilité dépassant 80 %. Si la chienne rentre en chaleurs avant la fin des trois semaines de traitement (cas fréquent), on peut stopper le traitement. (Nota : il existe une spécialité contenant de la cabergoline en médecine humaine (Dostinex®*) : un peu moins onéreuse que le Galastop®). (Badinand F 1995).

Bromocryptine (Parlodel®): 20µg/kg 2 fois/jour pendant 30 à 40 jours. (Dumon C 1992).

La métergoline (Contralac®) ne possède un effet dopaminergique qu'à forte dose : elle est donc peu utilisée pour tenter d'induire des chaleurs. (Fontobonne A, Fontaine E, 2008).

L'utilisation en anticipation de l'œstrus (déclenchement moins de 7 mois après les dernières chaleurs) est très décevante. (Fontobonne A, Fontaine E, 2008).).

6.2. Protocoles utilisant des gonadotrophines

L'ECG (Chronogest-PMSG®), anciennement nommée PMSG, est une hormone à effet FSH, qui stimule la folliculogénèse.

L' hCG (Chorulon®) est une hormone à effet LH qui déclenche l'ovulation.

Le protocole le plus souvent utilisé consiste en l'administration de 20 à 30UI/kg d'ECG pendant 5 à 9 jours, puis de 50UI/kg d'hCG au début de l'œstrus (frottis vaginal à fort index éosinophilique, ou follicules pré-ovulatoires visibles à l'échographie ovarienne), pour induire l'ovulation.

L'efficacité est limitée, on obtient souvent à peine 50% de taux de gestation. Une insuffisance lutéale est souvent observée du fait de la mauvaise qualité des corps jaunes obtenus. (Fontobonne A, Fontaine E, 2008).

6.3. Utilisation d'agonistes de la GnRH.

Technique peu utilisée car elle implique une administration pulsatile qui nécessite un matériel de perfusion très onéreux, ce qui est impossible en pratique. L'administration per os (comprimés) ou par voie parentérale (injections répétées) de façon discontinue est inefficace.

A l'avenir, des implants d'agonistes de la GnRH (desloréline (OVUPLANT®), nafaréline (GONAZON®...) devraient être commercialisés et pourraient permettre d'induire des chaleurs fertiles. (Dumon C 1992)

Partie expérimentale

MATERIEL ET METHODE :

1. Les animaux :

Notre effectif était composé de six chiennes qui ont subi en premier lieu un examen clinique ; un recueil de commémoratif sur leur statut reproductif et une évaluation clinique de l'état du cycle, suivi d'un déparasitage, en deuxième lieu notre expérimentation consistée à effectuer un écouvillonnage au niveau vaginal dans le but de réaliser des frottis, suivis d'un examen sous microscope après coloration pour déterminer le stade de leur cycle sexuel.

Les chiennes concernées par l'étude étaient gardées dans les mêmes conditions d'élevage avec le même régime alimentaire.

Notre travail était reparti en deux types de suivi de chaleurs sur deux groupes de chiennes :

Pour le premier consistait en un suivi de chaleur sur des chiennes ayant des chaleurs naturelles.

Pour le deuxième groupe l'expérimentation a consisté à un suivi de chaleur sur des chiennes qui ont subi un traitement d'induction de l'œstrus.

Le traitement d'induction de l'œstrus était destiné à 3 chiennes de notre effectif ; ce traitement était entrepris après une période au cours de laquelle une détermination de la période du cycle sexuel.

Le traitement a été entrepris pendant une période de 21 jours sans interruption avec réalisation à des intervalles réguliers de frottis vaginaux dans le but de mise en évidence de remaniement cytologique liée à l'effet du traitement.

Tableau 06 : Données générales sur les animaux mis sous traitement

Nom de la chienne et Race	Age	état de la reproduction	stade du cycle les jours de la réception (frotti)	Date de réception
Lisa croisé N°1	+ 3ans	Aucune information	Début de proestrus	03-10-2011
Xéna croisé N°2	+ 2ans	Absence de signe de chaleur Aucune gestation antérieure	Anoestrus	09-11-2011
Rita croisé N°3	+ 5ans	Absence de signe de chaleur multipart	Anoestrus	20-10-2011
Braque Allemand N°4	+ 3ans	Une gestation antérieure	début de proestrus	13-10-2011
Blondi Berger Allemand N°5	18mois	Aucune gestation antérieure Absence de signe de chaleur	Anoestrus	20-11-2011
Causette Caniche N°6	5ans	en chaleur avec perte vulvaire (sang) Aucune gestation antérieure	prooestrus	28-02-2012

2. Protocole thérapeutique d'induction :

Les chiennes (n°1, n°2, n°3) étaient celles concernées par le traitement, deux de nos sujets (n°2, n°3) était en phase d'anoestrus, et la chienne n°1 était en phase de métoestrus.

3. Nature du traitement :

La molécule utiliser était la Bromocriptine, un agoniste de la dopamine à effet anti prolactine, à usage humain connus sous le non commercial du Parlodel® 2,5mg

La dose quotidienne administré pour chaque chienne était de 1,25 mg/tranche de 20 kg ce qui correspond à une dose 1,25mg /20kg (poids maximal pour les 3 chienne).

Le traitement était entrepris pour les trois chiennes le 17-11-2011 et arrêter le 04-12-2011.

Durant la période du traitement un vomissement aigue fréquent durant les 10 premier jours chez les trois animaux à était observer et interpréter comme étant un effet secondaire du produits cette effet est également indiqué dans la notice du produit.

Le vomissement à disparus après 10 jours et aucun traitement anti vomitif na était entrepris.

4. Le suivi des chaleurs :

Le suivi de chaleurs consiste en des frottis vaginaux effectués sur des chiennes, les données concernant chacune d'entre elles sont répertoriées sur des dossiers individuels de chaque animal.

La détermination du stade du cycle était possible en réalisant les étapes suivantes :

- Ecouvillonnage vaginal.
- Etalement de l'écouvillon sur une lame pour un examen macroscopique.
- Fixation du frotti.
- Coloration par la technique HARRIS SHORR (coloration principale) plus MGG rapide (coloration secondaire).

NB :

La méthode de coloration principale utilisée dans la majeure partie de suivi de chaleur était Harris Shorr. La technique de MGG rapide était réservée pour confirmer le stade de kératinisation complète, le rapprochement de l'ovulation au cours de la période de l'œstrus, et pour écarter toute possibilité d'une infection vaginale par la mise en évidence des polynucléaires. Les frottis après préparation ont été observés sous microscope a fin de déterminer le stade du cycle sexuel en se basant sur la couleur, la forme, l'état du noyau, les cellules de la muqueuse vaginale, mais aussi sur la présence l'absence des globules rouge et polynucléaires (frottis avec fond sale ou propre) ce qui correspond a un stade particulier du cycle (décrit dans la bibliographie) et plus précisément la détermination du pourcentage (%) de l'indice éosinophilique qui est un facteur fortement indicateur d'un remaniement ovarien.

5. Matériel utilisé :

- Lames pour examen microscopique dimensions 26x76 mm, 1mm -1.2mm.
- Ecouvillons non stériles pour examen cytologique.
- Microscope optique binoculaire de marque : avec une capacité de grossissement de x10 x40 x100.
- Un fixateur spécial : Fixateur Cytologique pour frottis. (Cyto RAL 150 ml).
- Eau distillée pour rinçage des lames.

6. Colorant et protocole de coloration :

Pour déterminer le stade du cycle de chaque chienne, on examine les lames correspondant à chaque frottis après coloration.

a) Kits Diaconoestrus A&B :

Kit de détermination de la période d'ovulation chez la chienne par la coloration de Shorr-Hématoxyline stabilisée.

Principe :

La coloration par kit Diaconoestrus est une coloration de Shorr simplifiée. Elle permet la coloration des frottis vaginaux chez la chienne notamment pour détermination de la période d'ovulation.

Contenu des kits :

-kit Diaconoestrus A coffret de coloration

Hématoxyline stabilisée 100 ml

Différenciateur 100 ml

Colorant de Shorr 100 ml

-kit Diaconoestrus B coffret de rinçage

Solution de rinçage N°1 100 ml

Solution de rinçage N°2 100 ml

Solution de rinçage N°3 100 ml

Mode opératoire :

Temps de réalisation 16 minutes.

- Fixation
 - 1) Fixer le frottis a l'aide du CytoRal 1 à 5 sec
 - 2) Laisser sécher 1 minute
 - 3) Plonger le frottis dans la solution de rinçage N°1 10 minutes
- Coloration nucléaire
 - 4) Laver en plongeant dans un flacon d'eau distillée 10 passages
 - 5) Recouvrir le frottis avec l'Hématoxyline stabilisée 1 minute
 - 6) Laver en plongeant dans un flacon d'eau distillée 10 passages
 - 7) Différencier par le différenciateur 1 minute
- Coloration cytoplasmique
 - 8) Laver en plongeant dans le flacon de solution de rinçage N°2 10 passages
 - 9) Recouvrir le frottis avec le colorant de Shorr 2 minutes
 - 10) Laver en plongeant dans le flacon de solution de rinçage N°3 10 passages
 - 11) Sécher a l'air



DIAGNOESTRUS RAL

coffret A coloration code 363240

coffret B rinçage code 363250

Coffret A

100 ml Hématoxyline Stabilisée

100 ml Différenciateur RAL

100 ml Colorant de SHORR

Coffret B

100 ml rinçage 1

100 ml rinçage 2

100 ml rinçage 3

DETERMINATION DE LA PERIODE D'OVULATION CHEZ LA CHIENNE, COLORATION DE SHORR SIMPLIFIEE DES FROTIS VAGINAUX

Recommandations

- Utiliser le cytofixateur RAL code 361300
- Renouveler régulièrement les solutions de rinçage

Réactifs RAL - 3, rue la Boétie - 75008 PARIS - Tél. (1) 47 42 79 81 - Fax (1) 47 42 47 57

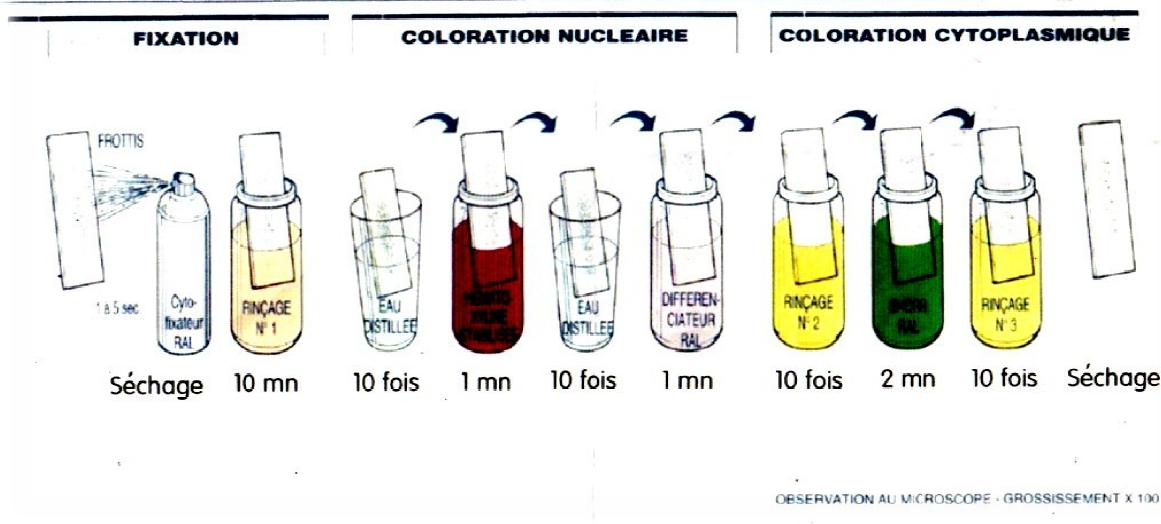


Figure 34 : technique de coloration HARRIS SHORR

Pour enrichir notre étude et nos résultats, on a effectué une deuxième coloration, décrite ci-dessous

b) Kit RAL 5 5 5 :

Kit de coloration rapide, il est complémentaire pour la cytologie des frottis sanguin (hématologie) la cytologie des urines et liquides (cyto-bactériologie) et la mise en évidence des piroplasmose et de *M.pachydermatis* (parasitologie vétérinaire).

Principe :

La coloration par le kit 555 est une variante rapide de la coloration de May-Grunwald Giemsa. En milieu aqueux tamponné, ce produit permet une coloration différentielle des frottis sanguins. L'interprétation des frottis sanguine et cytologique ainsi que celle des coupes histologique est identique à celle des coloration classique (MGG)

Contenu du kit :

Flacon 1 : Fix-RAL 555	1 x 100 ml
Flacon 2 : Eosine-RAL 555	1 x 100 ml
Flacon 3 : Bleu-RAL 555	1 x 100 ml

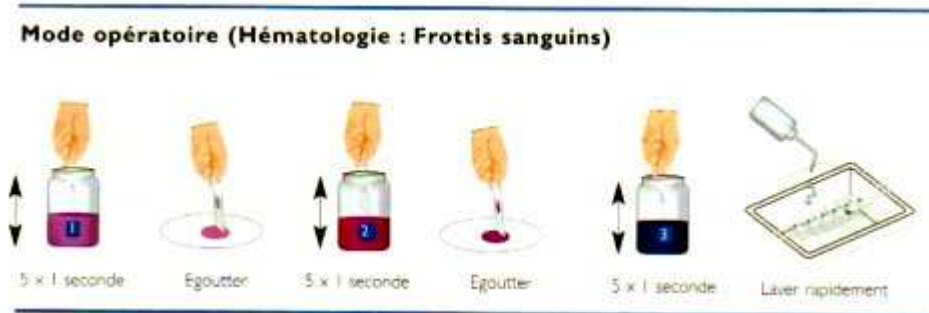


Figure 35 : technique de coloration May-Grunwald Giemsa.

7. L'observation des lames :

Les lames ont été visualisées à l'aide d'un microscope binoculaire, muni d'un oculaire d'un grossissement de 10. Quatre objectifs étaient disponibles, d'un grandissement respectif de x4, x10, x40, et x100. Les grossissements indiqués par la suite représentent ceux du microscope, les lames sont analysées dans l'ordre chronologique.

Les frottis étaient d'abord visualisés au plus faible grossissement (x 40) dans leur totalité. Ceci nous donnait les informations suivantes :

- La coloration majoritaire du frottis (acidophilie ou basophilie) ;
- La concentration cellulaire

Résultats et discussion

Résultats

Les résultats de nos suivis d' chaleurs on été répertoriés sur des tableaux

Tableau 07 : Suivi des chaleurs avant la mise au traitement

Chiennes	Date	Observations		Interprétation
		Examen visuel	écouvillon	Du frotti
Chienne N°1 Liza	Le 21-10-2011	Œdème vulvaire Présence d'écoulement	rouge	- Fond légèrement sal - Présence des amas de cellules intermédiaires en voie de kératinisation - indice éosinophiles < 50% « Pro-œstrus »
	Le 23-10-2011	Œdème vulvaire Réduction de l'écoulement	rosé	- Fond légèrement sal - Présence des amas de cellules intermédiaires en voie d'kératinisation - indice éosinophiles < 50% « Pro-œstrus »
	Le 24-10-2011	Œdème vulvaire Réduction de l'écoulement	rosé	- fond claire - quelque globule rouge - début de kératinisation massive - indice éosinophiles < 50% « fin de Pro-œstrus »
	Le 27-10-2011	Réduction de l'œdème vulvaire Pas	rosé	- fond claire - Présence des amas de cellules kératinisé

		d'écoulement		- indice éosinophiles = 80 % -Œstrus période d'ovulation
	Le 30-10-2011	Réduction de l'œdème vulvaire Pas d'écoulement	Blanc rosé	- fond claire - Présence des amas de cellules kératinisé - indice éosinophiles = 80 % -Œstrus période d'ovulation
Chienne N°2 Xéna	Le 09-11-2011	Absence de signe de chaleur Pas d'écoulement	Blanc légèrement sale	- fond claire - Présence de quelque amas de cellule parabasale - absence de neutrophile et de globule rouge « Anoestrus »
Chienne N°3 Ritta	Le 21-10-2011	Absence de signe de chaleur Pas d'écoulement	Blanc, propre	- fond claire - Présence de quelque cellule parabasale - absence de globule rouge et de polynucléaire -Aucun remaniement ovarien
	Le 22-10-2011	Absence de signe de chaleur Pas d'écoulement	Blanc, propre	- fond claire - Présence de quelque cellule parabasale - absence de globule rouge et de polynucléaire

				-Aucun remaniement ovarien
	Le 23-10-2011	Absence de signe de chaleur Pas d'écoulement	Blanc, propre	- fond claire - Présence de quelque cellule parabasale - absence de globule rouge et de polynucléaire -Aucun remaniement ovarien
	Le 24-10-2011	Absence de signe de chaleur Pas d'écoulement	Blanc, propre	- fond claire - Présence de quelque cellule parabasale - absence de globule rouge et de polynucléaire -Aucun remaniement ovarien
	Le 27-10-2011	Absence de signe de chaleur Pas d'écoulement	Blanc, propre	- fond claire - Présence de quelque cellule parabasale - absence de globule rouge et de polynucléaire -Aucun remaniement ovarien
	Le 30-10-2011	Absence de signe de chaleur Pas d'écoulement	Blanc, propre	- fond claire - Présence de quelque cellule parabasale - absence de globule rouge et de polynucléaire -Aucun remaniement

Tableau 08 : suivi des chaleurs au cours du traitement

Chiennes	Date	Observations		Interprétation
		Examen visuel	Ecouvillon	Du frotti
Chienne N°1 Liza arrivée	Le 21-11-2011 5em jours du traitement	Absence de signe de chaleur Pas d'écoulement	Blanc légèrement sale	-fond claire -présence de cellules parabasales et intermédiaires et amas de cellules non kératinisées avec quelques polynucléaires -mét-œstrus -indice éosinophiles < 20 %
	Le 23-11-2011 7em jours du traitement	Absence de signe de chaleur Pas d'écoulement	Blanc légèrement sale	-fond muqueux -présence de cellules intermédiaires en voie de kératinisation -présence d'un changement cytologique vers un début de pro-œstrus -indice éosinophiles < 30 %
	Le 28-11-2011 12em jours du traitement	Absence de signe de chaleur Pas d'écoulement	Muqueux légèrement rose claire	-fond légèrement sal -présence de grandes cellules intermédiaires agglomérées en amas avec quelques cellules kératinisées -début de pro-œstrus
	Le 07-12-2011	Absence de signe	Muqueux	-fond claire

	18em jours du traitement	de chaleur Pas d'écoulement	légèrement rose claire	-présence des amas de cellules intermédiaires et des cellules kératinisées -indice éosinophiles < 50 %
	Le 11-12-2011 21em jours du traitement			-milieu de pro-œstrus -indice éosinophiles > 70 %
Chienne N°2 Xéna 09-11-2011	Le 21-11-2011 5em jours du traitement	Absence de signe de chaleur Pas d'écoulement	Blanc légèrement sale	- fond claire - Présence de quelque amas de cellule parabasale - absence de neutrophile et de globule rouge « Anoestrus »
	Le 23-11-2011 7em jours du traitement	Absence de signe de chaleur Pas d'écoulement	Blanc légèrement sale	- fond claire légèrement sal - Présence de cellule parabasale - absence de globule rouge - indice éosinophiles < 10 %
	Le 28-11-2011 12em jours du traitement	Absence de signe de chaleur Pas d'écoulement	Blanc légèrement sale	- fond muqueux - Présence de quelque cellule intermédiaire - absence de globule rouge - légère changement cytologique - indice éosinophiles

				< 30 % -Anoestrus
	Le 04-12-2011 18em jours du traitement	Absence de signe de chaleur Pas d'écoulement	Muqueux légèrement rose claire	- Présence de cellule intermédiaire en amas avec quelque cellule en voie de kératinisation - Présence de rare polynucléaire et de globule rouge - légère changement cytologique - indice éosinophiles < 50 % -Fin d'anoestrus
	Le 07-12-2011 21em jours du traitement	Absence de signe de chaleur Pas d'écoulement	Muqueux légèrement rose claire	- net changement cytologique - Présence de cellule kératinisé hyperpié avec quelque cellule intermédiaire - Présence de globule rouge - indice éosinophiles = 50 % Pro-œstrus
Chienne N°3 Ritta	Le 21-11-2011	Absence de signe de chaleur Pas d'écoulement		- fond claire - quelque amas de cellule parabasale - absence de polynucléaire et de neutrophile - indice éosinophiles < 10 % -Anoestrus

	Le 23-11-2011	Absence de signe de chaleur Pas d'écoulement		- fond claire - quelque amas de cellule parabasale - absence de polynucléaire et de neutrophile - indice éosinophiles < 10 % -Anoestrus
	Le 28-11-2011	Absence de signe de chaleur Pas d'écoulement		- fond claire - quelque amas de cellule parabasale - absence de polynucléaire et de neutrophile - indice éosinophiles < 10 % -Anoestrus
	Le 04-12-2011	Absence de signe de chaleur Pas d'écoulement		- fond claire - quelque amas de cellule parabasale - absence de polynucléaire et de neutrophile - indice éosinophiles < 10 % -Anoestrus

Tableau 09 : Suivi des chaleurs physiologique

Chiennes	Date	Observations		Interprétation
		Examen visuel	écouvillon	Du frotti
Chienne N°4 Braque allemand	Le 20-10-2011	Présence d'écoulement	Rouge sale	-fond sal - présence de cellule intermédiaire en voie de kératinisation plus quelque globule rouge - indice éosinophiles $\geq 50\%$ -Pro-œstrus
	Le 21-10-2011	Présence d'écoulement	Rouge sale	- présence de cellule intermédiaire et plusieurs cellules kératinisées de grand volume et quelque globule rouge - indice éosinophilique $\geq 60\%$ -Pro-œstrus
	Le 23-10-2011	Réduction de l'écoulement	Rouge sale	- présence de globule rouge - dominance de cellule kératinisée Fin de pro-œstrus
	Le 24-10-2011	Réduction de l'écoulement	Rouge rosé sale	- fond claire - dominance des amas cellulaires kératinisés - indice éosinophiles $\geq 80\%$ -Début d'œstrus
	Le 30-10-2011	Ecoulement jaunâtre (mucus)	Sale, rose claire	- fond muqueux - présence de polynucléaire quelque

				globule rouge et des cellules intermédiaires - indice éosinophiles < 40%
Chienne N°5 Blondi	Le 07-02-2012	Œdème vulvaire Présence d'écoulement	Rouge sale	- fond sal - début de kératinisation avec des cellules intermédiaires et quelque globule rouge -indice éosinophiles 50% -Pro-œstrus
	Le 09-02-2012	Œdème vulvaire Réduction de l'écoulement	Rouge rosé sale	-fond légèrement sal -présence de cellules intermédiaires et des cellules en voie de kératinisation -indice éosinophiles $\geq$ 50% -Pro-œstrus
	Le 13-02-2012	Œdème vulvaire Réduction de l'écoulement		-fond claire -quelques amas de cellules kératinisés -indice éosinophiles > 60 %
	Le 15-02-2012	Œdème vulvaire Réduction de l'écoulement		-présence de plusieurs amas de cellules kératinisés et quelque globule rouge -kératinisation $\geq$ 90 % -œstrus
	Le 17-02-2012	Œdème vulvaire Réduction de l'écoulement		-fond claire -kératinisation 100 % avec de très rares globules rouges

				-œstrus période d'ovulation
	Le 23-02-2012	Réduction de l'œdème vulvaire, absence d'écoulement	Sale	- fond sal - présence de quelques cellules intermédiaires et quelques cellules kératinisées - indice éosinophiles < 40 % -fin d'œstrus
	Le 13-03-2012	Vulve non tuméfié, pas d'écoulement	Propre	-fond propre -petit amas de cellules intermédiaire et quelques polynucléaires -absence e cellules kératinisés -met- œstrus
Chienne N°6 Causette	Le 29-02-2012	Œdème vulvaire Présence d'écoulement	Rouge sale	-fond sal -quelques amas cellulaire et globules rouges -indice éosinophiles > 60 % -Fin de pro- œstrus
	Le 03-03-2012	Œdème vulvaire Présence d'écoulement	Rouge sale	-fond sal -plusieurs amas cellulaire et quelque globule rouge -kératinisation ≥ 80 % -début d'œstrus
	Le 04-03-2012	Œdème vulvaire Présence d'écoulement	Rouge rosé sale	-kératinisation de 100 % -plusieurs amas de cellules kératinisées -période d'ovulation
	Le 06-03-2012	Œdème vulvaire	Rouge rosé	-fond propre

		Présence d'écoulement	sale	-kératinisation < 70 % -quelques cellules intermédiaires -fin d'œstrus
--	--	--------------------------	------	---

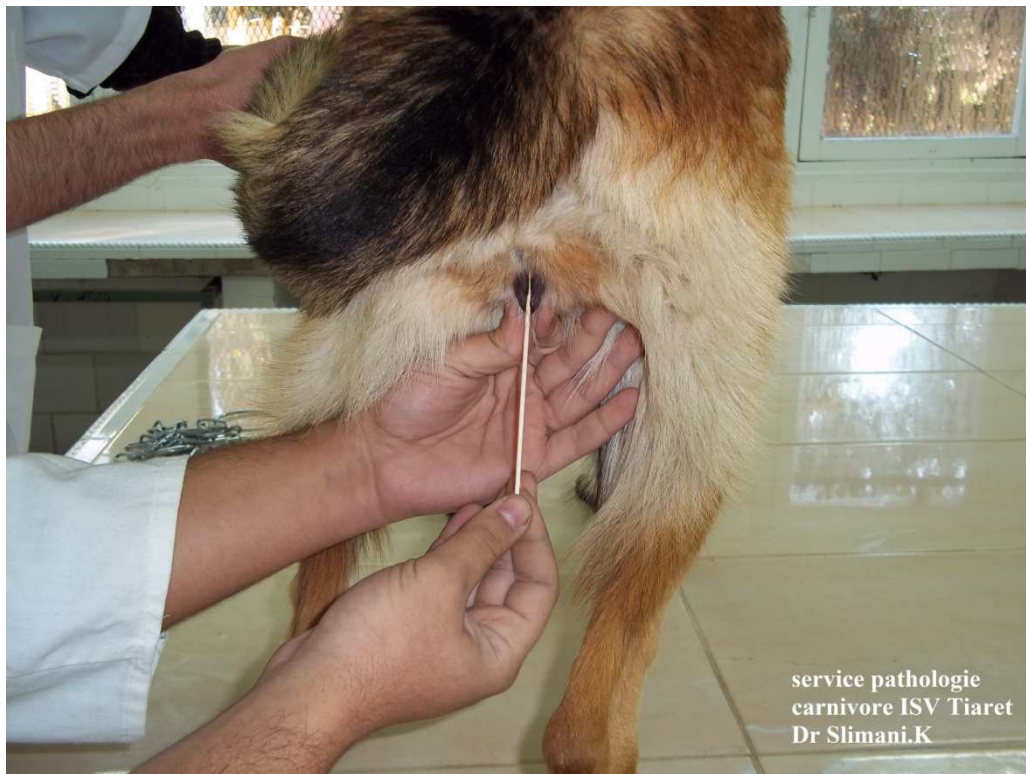


Figure 36 : Technique de prélèvement par écouvillonnage



Figure 37 : Ecouvillon rouge



Figure 38 : Etalement d'un écouvillon sur une lame



Figure 39 : fixation du frottis



service pathologie
carnivore ISV Tiaret
Dr Slimani.K

Figure 40 : Cyto fixateur



service pathologie
carnivore ISV Tiaret
Dr Slimani.K

Figure 41 : kit de coloration HARRIS SHORR



Figure 42: Kit de coloration May-Grunwald Giemsa

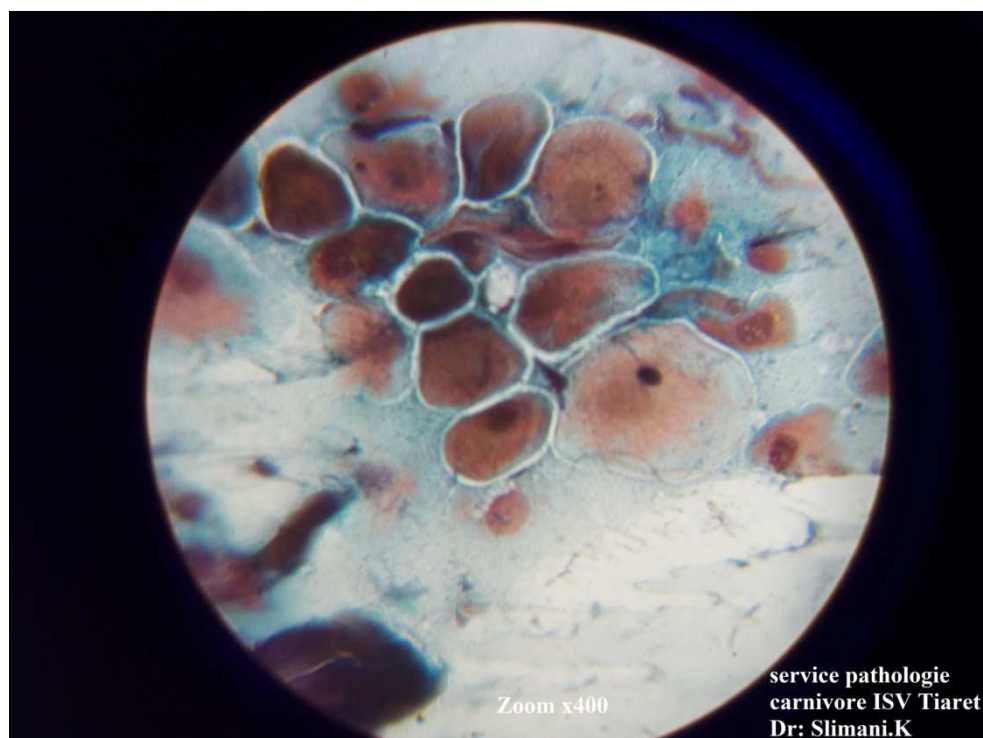


Figure 43 : frottis vaginal d'un début de pro-œstrus les cellules deviennent progressivement de plus en plus grandes et plus anguleuses et prennent une teinte rosé

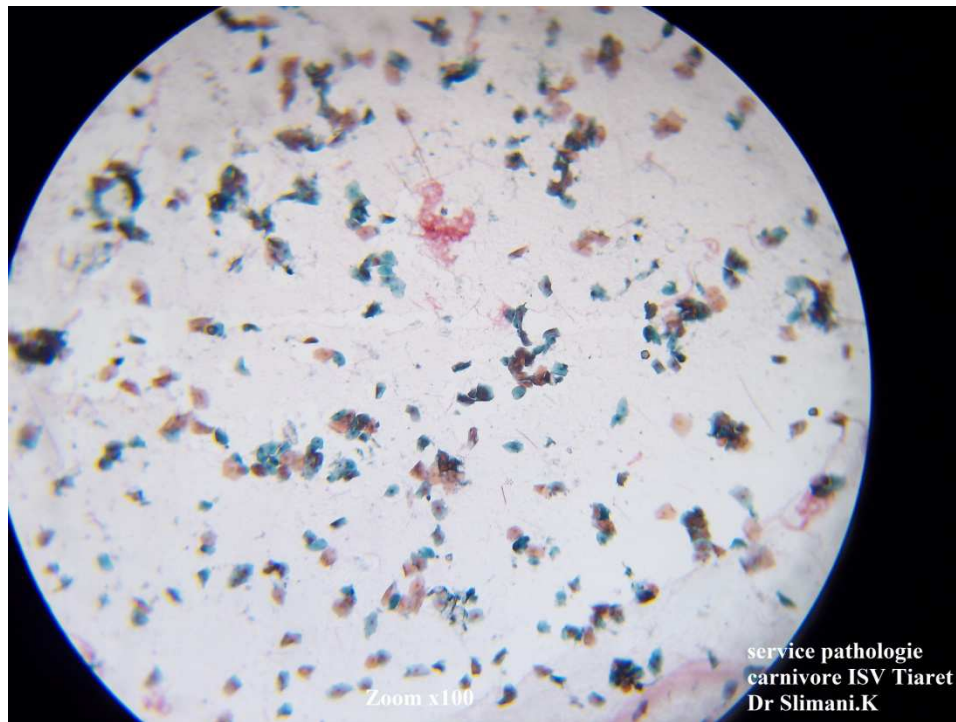


Figure 44 : frottis vaginal début de pro-œstrus cellules intermédiaires en voie de kératinisation indice éosinophile inférieur à 50%.



Figure 45 : frottis vaginal de pro-œstrus fond muqueux avec présence de cellules en voie de kératinisation de forme géométrique variable avec débris cellulaires

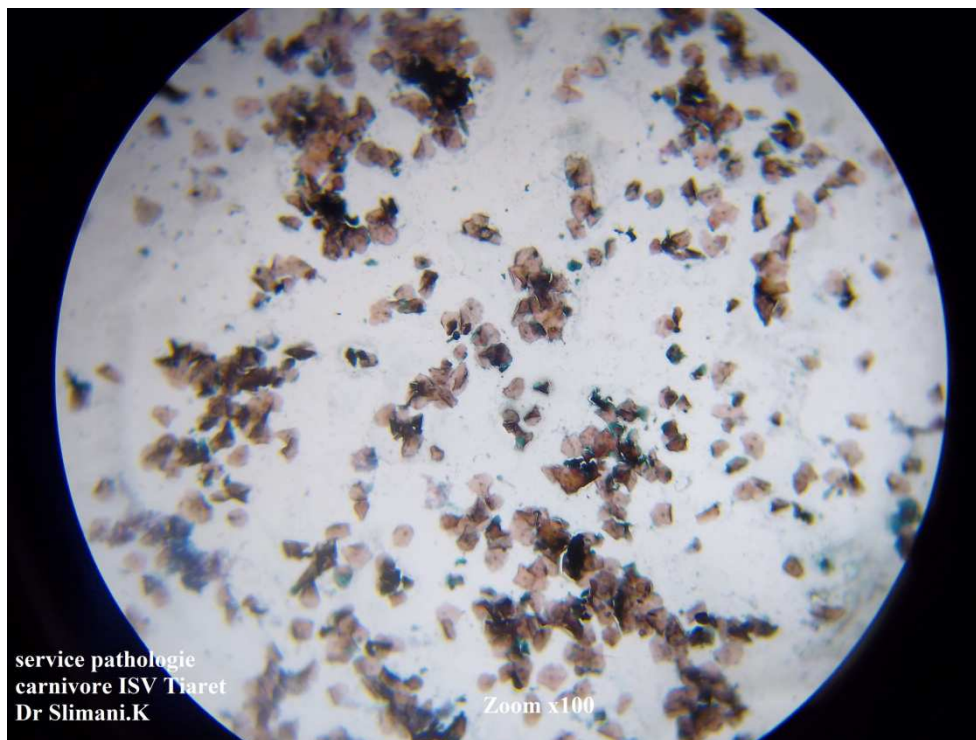


Figure 46 : frottis vaginal de pro-œstrus présence de cellules kératinisées de plus en plus nombreuses en amas indice éosinophile = 50 %

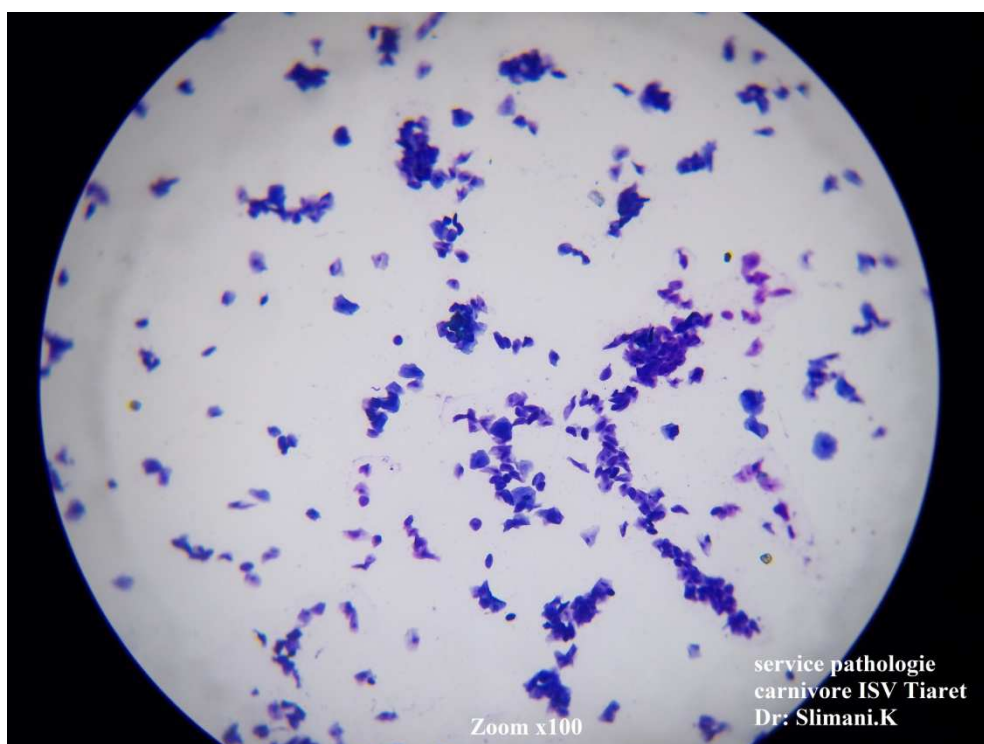


Figure 47 : frottis vaginal de fin de pro-œstrus présence de cellules kératinisées de couleur légèrement bleues en amas indice éosinophile supérieur à 70%

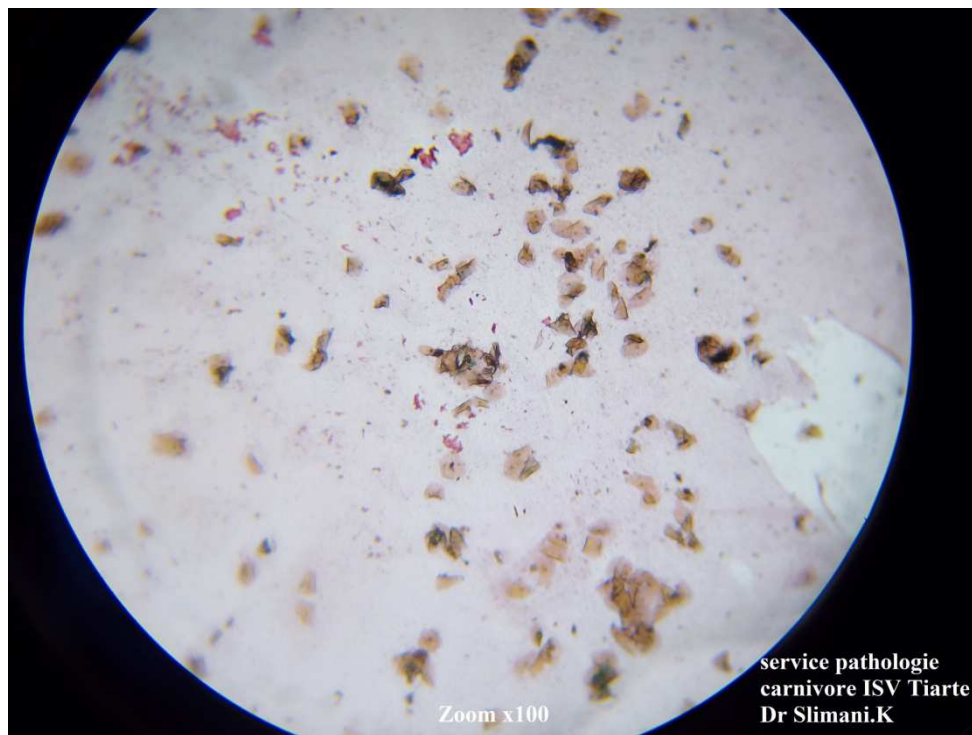


Figure 48 : frottis vaginal de fin de pro-œstrus présence de globules rouges et de cellules kératinisées plus en moins en amas et éparpillées indice éosinophile supérieure à 70%

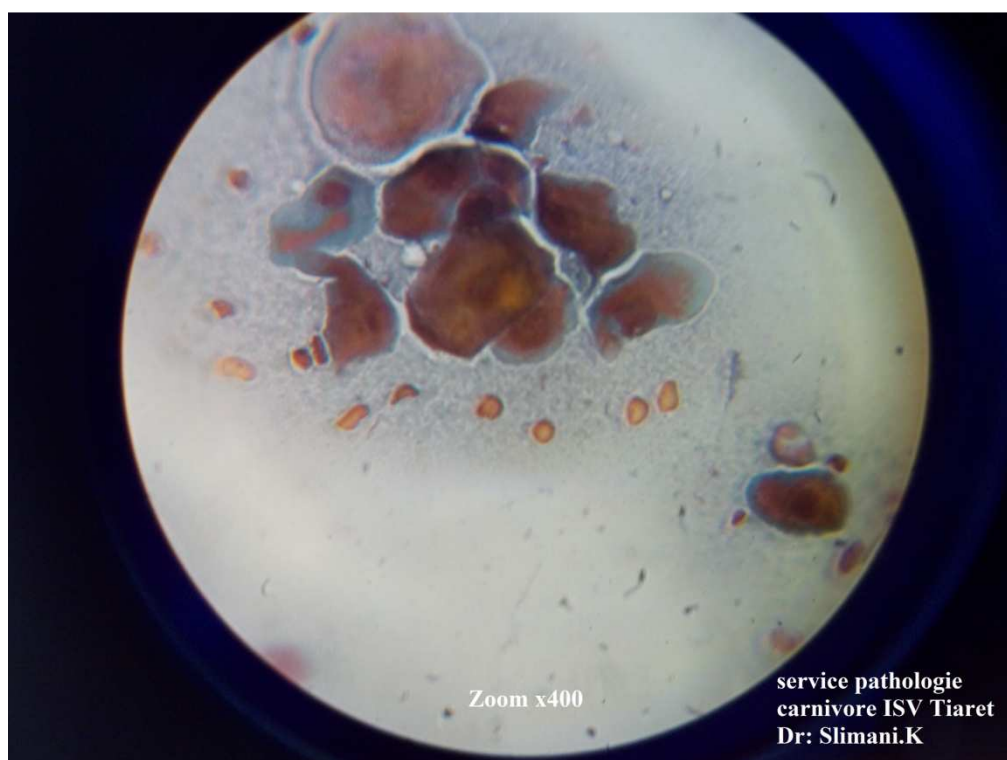


Figure 49 : frottis vaginal fin de pro-œstrus présence de cellules kératinisées de couleur rose foncé et quelques globules rouges

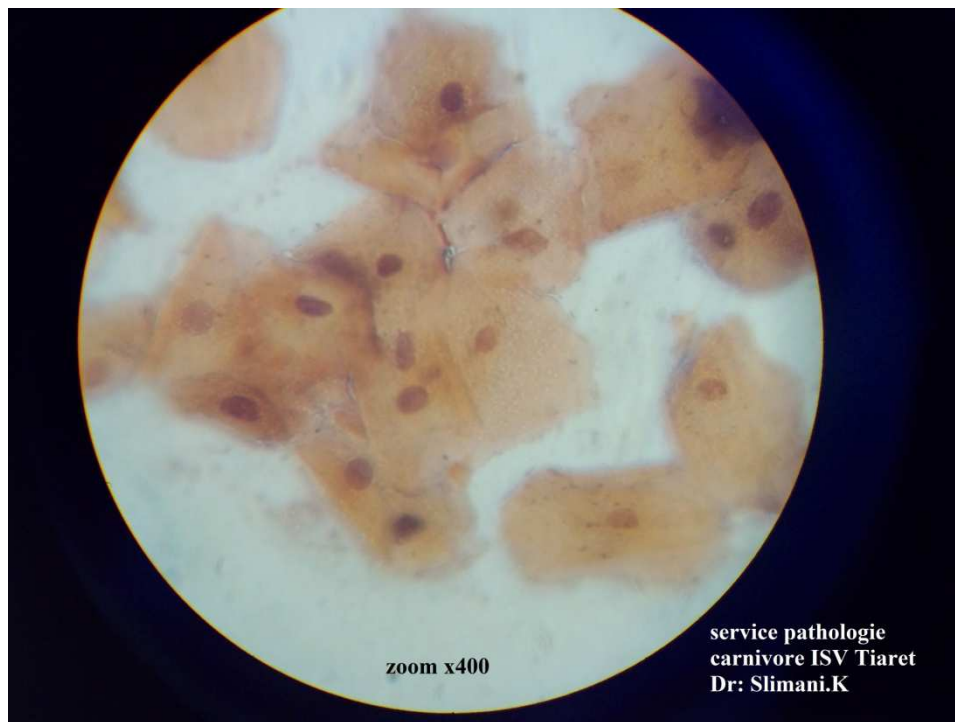


Figure 50 : frottis vaginal d'œstrus présence de cellules kératinisées rosées acidophiles regroupées en amas

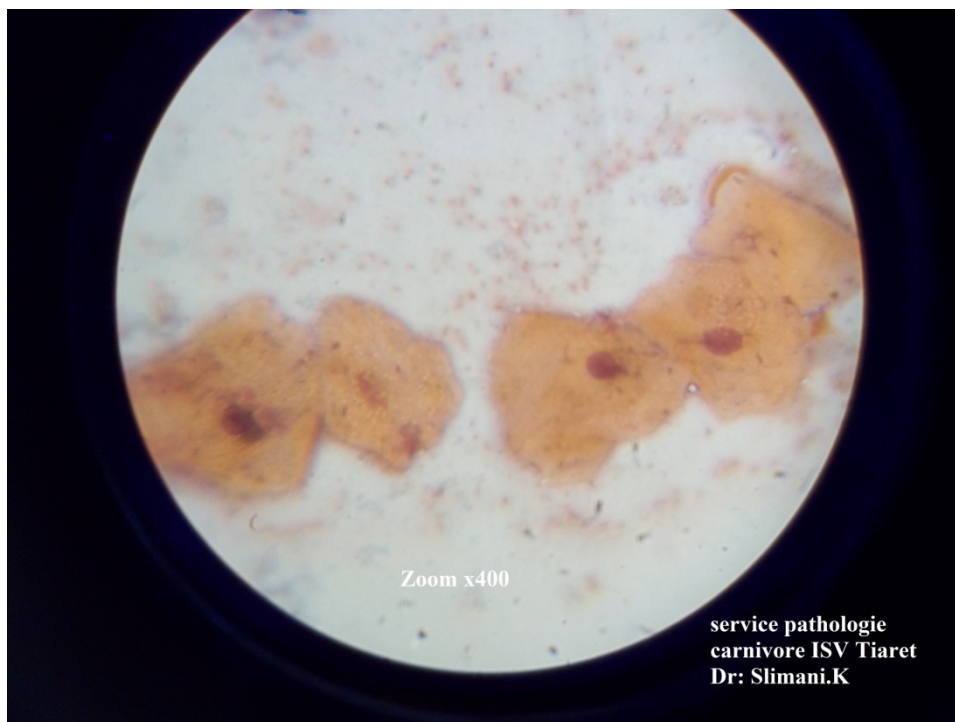


Figure 51 : frottis vaginal propre on trouve uniquement des cellules superficielles acidophiles rosées en présence de quelques globules rouges

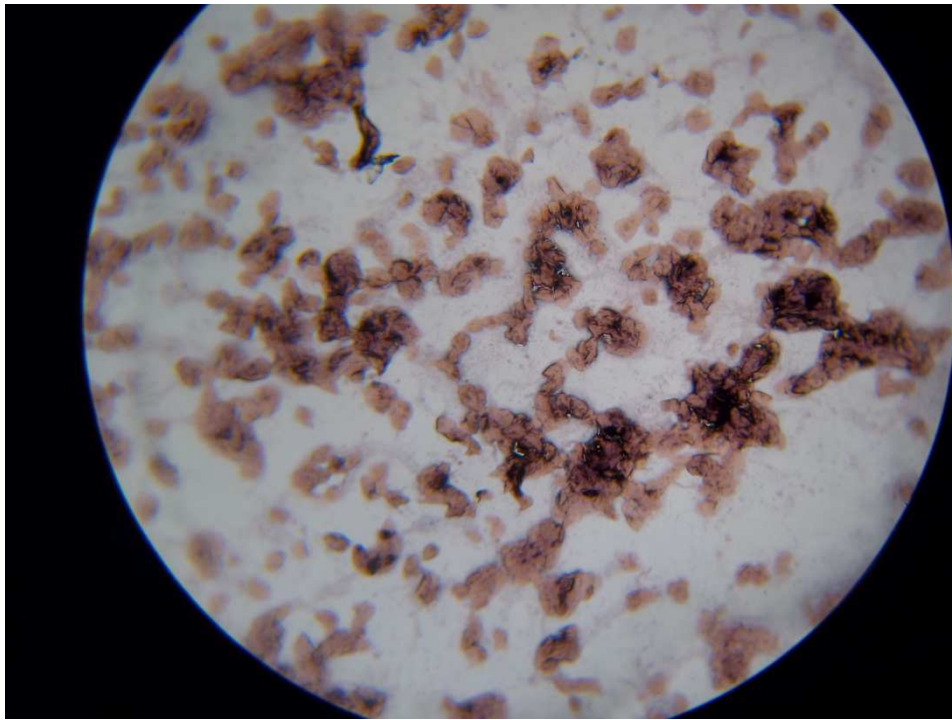


Figure 52 : frottis vaginal d'œstrus présence de cellules kératinisées le noyau et souvent pycnotique ou invisible cellules de plus en plus agglomérées en amas indice éosinophile supérieur à 80% période d'ovulations

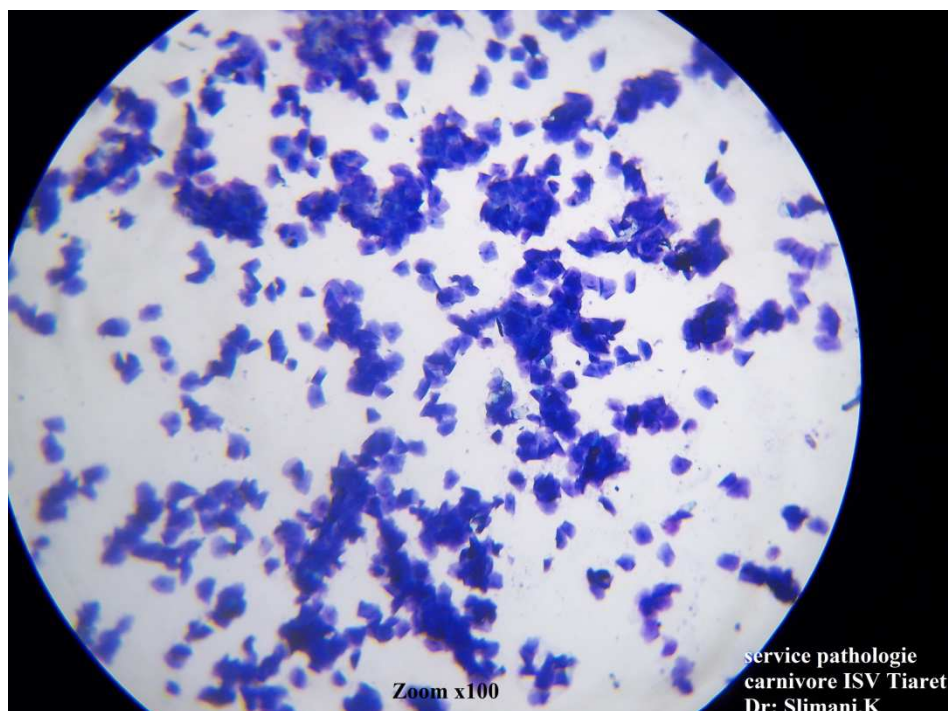


Figure 53 : frottis vaginal d'œstrus présence de grand amas cellulaire kératinisé indice éosinophile supérieur à 80% période d'ovulations

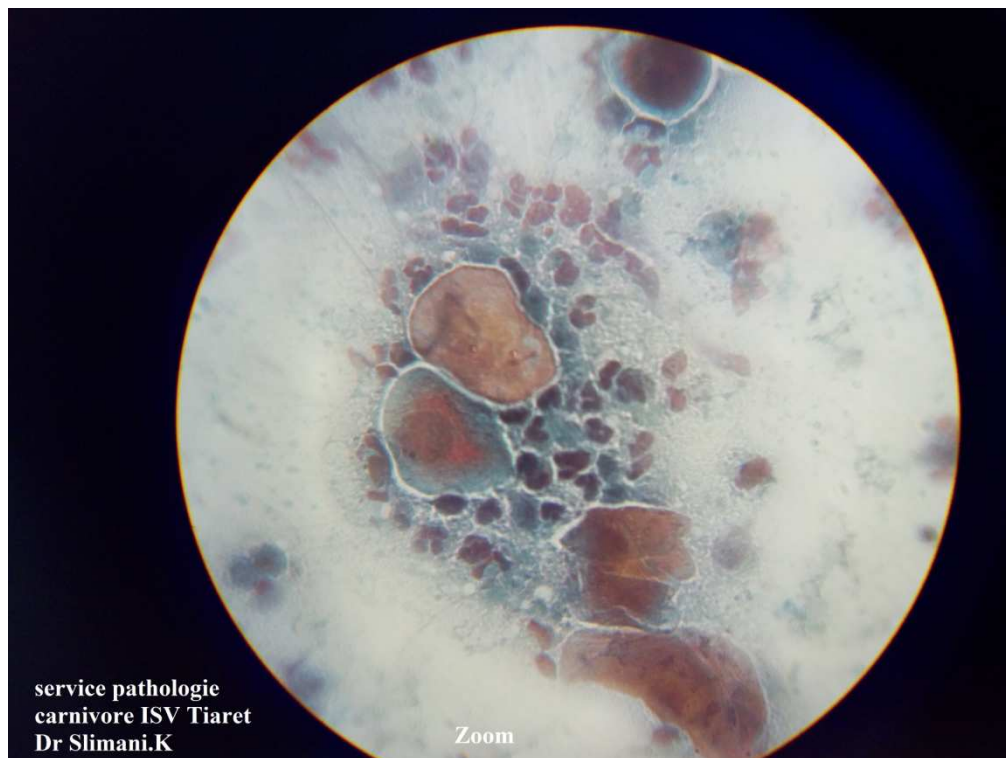


Figure 54 : frottis vaginal de mét-œstrus cellules vaginales rondes non kératinisées basophiles avec présence de neutrophiles qui peuvent être visible

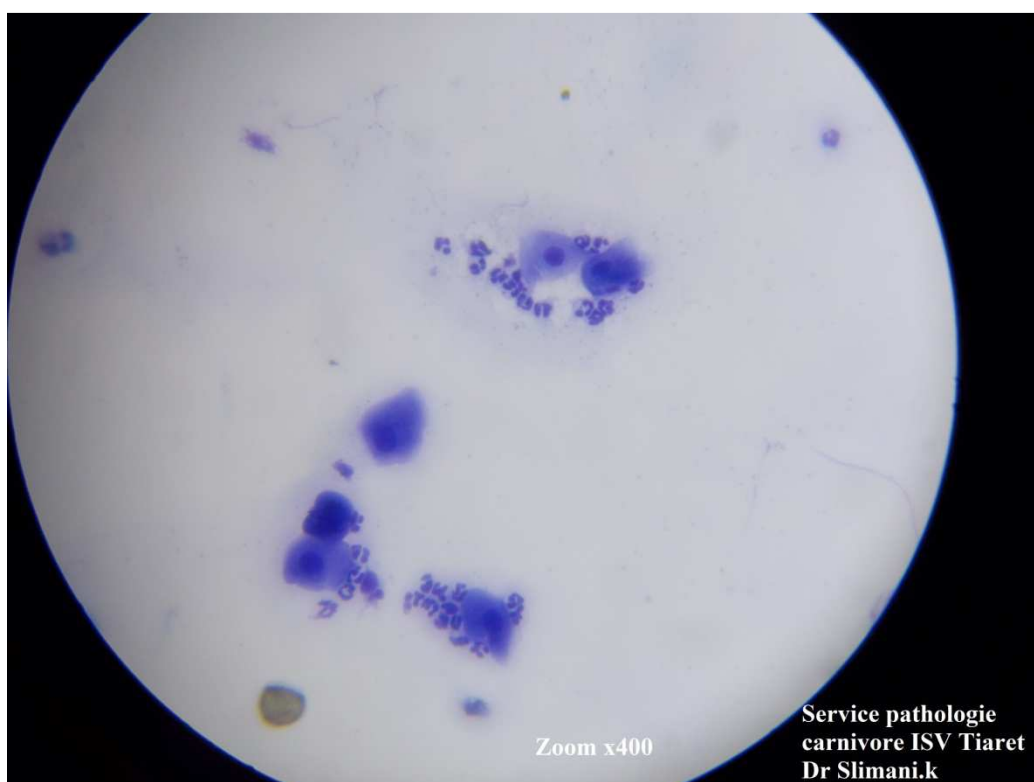


Figure 55 : frottis vaginal de mét-œstrus les polynucléaires peuvent être visible avec cellules à grand noyau (intermédiaires, basophiles) indice éosinophile inférieur à 20%

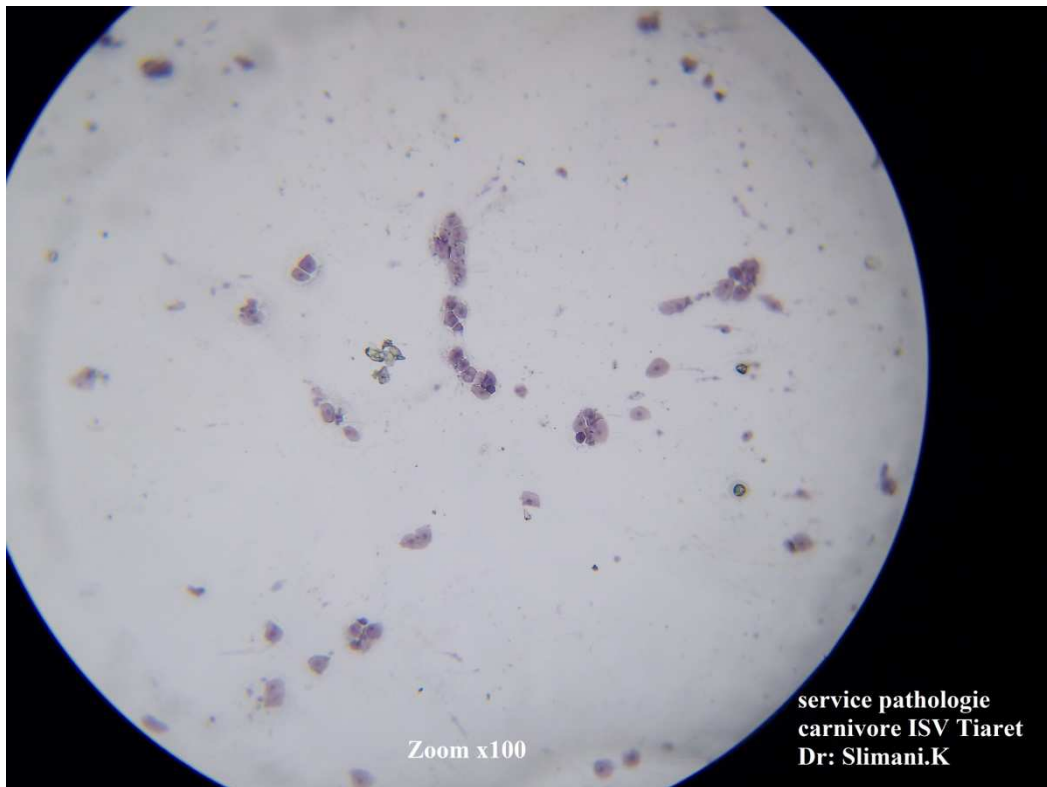


Figure 56 : frottis vaginal d'anoestrus présence de cellules parabasales qui se colorent en bleu claire indice éosinophile inférieur à 10%



Figure 57 : frottis vaginal d'anoestrus coloration bleuté des cellules parabasales qui présentent un grand noyau

Discussion

Le suivi des chaleurs par la méthode de cytologie vaginale, et la coloration des frottis par deux techniques de coloration différentes (HARRIS SHORR et May-Grunwald Giemsa) , nous ont permis d'identifier avec précision les différentes phases du cycle œstral chez la chienne, par la mise en évidence des changements qui affectent les cellules de la muqueuse vaginale en fonction des variations hormonales au cours du cycle.

Cela nous a permis également d'identifier l'existence ou l'absence de remaniements au niveau de l'ovaire essentiellement le moment d'ovulation, qui est un phénomène dont le moment de sa manifestation reste important à déterminer à travers l'examen des frottis vaginaux. Ce qui permet de choisir ainsi le moment optimal pour saillir une chienne en chaleur ou encore réaliser une insémination artificielle.

Un traitement d'induction des chaleurs et leur suivi, ont été réalisés sur des chiennes d'expérimentation reçues en anoestrus, en se basant sur un protocole d'induction cité en bibliographie. Nous avons également entrepris des suivis des chaleurs naturelles.

Une fois le traitement entamé, en respectant un rythme adapté, et des doses indiquées en bibliographie, nous avons pu suivre les changements cytologiques induits par la molécule utilisée.

Les résultats obtenus concordent parfaitement avec les données bibliographiques de plusieurs auteurs concernant les variations cellulaires décrites pour chaque période de cycle ainsi que pour le moment d'ovulation FELDMAN, NELSON (1996).

Le protocole d'induction des chaleurs utilisé au cours de notre étude (en utilisant une molécule à base d'anti- prolactine « Bromocriptine Parlodel® » décrite en bibliographie), a eu un effet positif , plus précisément a provoqué des changements au niveau cytologique qui ont été observés par l'examen des frottis, ce qui explique l'existence de remaniements ovariens, indiquant ainsi la fiabilité du protocole utilisé, malgré quelques effets secondaires constatés (vomissements durant la première semaine du traitement) ; ce traitement a présenté également un avantage sur le plan économique : peu coûteux ,facile à entreprendre (voie orale) , mais avec nécessité de pratiquer des frottis vaginaux indispensables pour déterminer tous changements.

En fin les deux méthodes de coloration employées en partie expérimentale qui sont décrites dans la bibliographie, restent des méthodes fiables et crédibles en particulier pour la méthode HARRIS SHORR qui permet une coloration différentielle des cellules en fonction de leur degré de kératinisation, et permet ainsi de différencier entre les cellules basophiles et acidophiles décrites par FELDMAN, NELSON (1996).

La coloration May-Grunwald Giemsa conserve également un avantage, car elle permet essentiellement de mettre en évidence les polynucléaires et les hématies. Ceci a été constaté au cours de notre expérimentation, et concorde parfaitement avec les résultats de NEVEUX (1999). C'est une coloration uni-chrome qui ne permet de visualiser que les critères morphologiques des cellules, cette observation correspond parfaitement aux observations de JOHNSTON SD, et Al (2001).

N.B :

Les chiennes d'expérimentation qui ont subis le traitement d'induction des chaleurs, et qui étaient en anoestrus, ont présentées des changements cytologiques, mais en absence des signes externes de chaleur (œdème et écoulement vulvaire), cela peut s'expliquer par le fait que la durée du traitement était limitée à vingt jours (20), donc insuffisante pour provoquer des signes externes visibles, et aussi par le fait que notre bute essentiel était d'observer l'existence ou l'absence de changement cytologique que provoque le médicament.

Reste à signaler que la cytologie vaginale nécessite l'association à un dosage de progestérone dans le cas où on souhaite déterminer avec plus d'exactitude le moment d'ovulation. Ce dosage n'a pas était disponible au sein de notre institut.

Conclusion

Conclusion

Le suivi de reproduction par technique de cytologie vaginale représente un atout primordial qui garde tout son intérêt dans la détermination de différentes phases du cycle sexuel de la chienne. L'avantage qui offre la cytologie vaginale pour le clinicien spécialiste dans le domaine de la reproduction canine est de pouvoir le moment optimal de l'ovulation dans le cas où le propriétaire souhaite faire saillir ou inséminer artificiellement sa chienne.

Le suivi des chaleurs par technique de cytologie vaginale est aussi indispensable lorsqu'un traitement d'induction des chaleurs est envisagé.

Références et bibliographie

REFERENCES ET BIBLIOGRAPHIE

BARON F. *Etude de la période pré-ovulatoire chez la chienne Berger Allemand*. Thèse Méd. Vét., Alfort 2006,90p

BLENDIGER K. Physiology and pathology of the estrous cycle of the bitch. *Proceedings of the SCIVAC Congress, Rimini, Italy, 2007*, [<http://www.ivis.org>].

CHRISTIE DW, BELL ET. (1971) Endocrinology of the oestrous cycle in the bitch. *J. small Anim. Pract.*, 12, 383-389.

CHRISTIE DW, BELL ET. (1971) Some observations on the seasonal incidence and frequency of oestrus in breeding bitches in Britain. *J. small Anim. Pract*, 12, 159-167.

CHRISTIE DW, BELL ET. (1971) Some observations on the seasonal incidence and frequency of oestrus in breeding bitches in Britain. *J. small Anim. Pract*, 12, 159-167.

CHRISTENSEN GC, EVANS HE. Female genital organs. In: MILLER ME. *Anatomy of the dog*. Philadelphia: W.B Saunders Company, 1993, 537-546.

CHAFFAUX S., BOSSE Ph. *Biologie de la reproduction du chat et du chien*. Encyclopédie Vétérinaire, Reproduction – 0100, pp. 1-16

CONCANNON P.W. Estrus induction in dogs: Approaches, Protocols and applications. *Proceedings of the world congress WSAVA, 2005*, [<http://www.ivis.org>].

CONCANNON PW. (1987) Endocrinology of the oestrous cycle in the bitch. In Burke editor. *Small animal reproduction and infertility*. Philadelphia : Lea & Febiger. 23-77.

CONCANNON PW, McCANN JP, TEMPLE M. (1989) Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. . *J . Repro Fert. Supp.*, 39, 3-25.

CORRE J., ROZENBAUM M. *Elaboration d'un document pédagogique de reproduction canine*. Thèse Méd. Vét., Alfort 2004.

DONE SH, GOODY PC, EVANS SA et al.. *Color atlas of veterinary anatomy, volume 3* London: Mosby-Wolfe, 1996, 455p.

DE GIER J., KOOISTRA H.S., DJAJADININGRAT-LAANEN S.C. *et al.* Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol-17 β , progesterone, prolactin, and α -melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch. *Theriogenology*, 2006, **65**, pp. 1346-1359.

FONTBONNE A, BUFF S, GARNIER F. (2000) Données récentes en physiologie et endocrinologie sexuelles dans l'espèce canine. *Point Vét.*, **31**, 395-401

FELDMAN , NELSON (1996) Ovarian cycle and vaginal cytology. *In : Canine and feline endocrinology and reproduction*. 2nd ed. Philadelphia : WB Saunders, 526-546

FREVILLE A., *Conduite à tenir en obstétrique canine et féline*. Thèse Méd. Vét., Alfort 2005.

FONTBONNE A., BUFF S., GARNIER F. Données récentes en physiologie et endocrinologie sexuelles dans l'espèce canine. *Point Vét.*, 2000, **31** (209), 395-401.

FONTBONNE A, BUFF S, BOENDER G. Le vétérinaire et la reproduction. [OCD ROM], Lures : Vetoquinol diagnostics, 1998.

GRIFFITHS WFB., AMOROSO EC. (1939) Prooestrus, oestrus, ovulation and mating in the greyhound bitch. *Vet. Rec.*, **51**, 1279-1284.

GOODWIN M, GOODING KM, REGNIER F. (1979) Sex pheromone in the dog. *In : Science*, **203**, 559-561.

GOODMAN M. Ovulation timing: concepts and controversies. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, mars 2001, **31**, n°2, clinical theriogenology, pp. 219-235.

HEAPE W. (1900) The sexual season of mammals and the relationship of "pro-oestrus" to menstruation. Part I. *In: Q. J. Microbiol. Sci.*, **44**, 1-70.

HOLST PA, PHEMISTER RD. (1974) Onset of diestrus in the beagle bitch: definition and significance. *Am. J. Vet. Res.*, **35** (3), 401-406.

HOLST PA, PHEMISTER RD. (1975) Temporal sequence of events in the oestrous cycle of the bitch. *Am. J. Vet. Res.*, **36** (5), 705-706.

HOFFMANN B., Hormonal control of pregnancy and parturition in the dog, *Proceedings of the world congress WSAVA, 2004*, [<http://www.ivis.org>].

JOHNSTON SD, OLSON PNS., ROOT KUSTRITZ MV. (2001) The canine estrous cycle. *In : Canine and feline theriogenology*. Philadelphia : WB Saunders, 16-31.

JOHNSTON SD. (1988) The bitch. *In : Reproduction : Small companion animals proceedings*. Sydney, 8-12 août 1988. Sydney : Post Graduate in Veterinary Science, 69- 87.

JOHNSTON SD. (1988) The bitch. *In : Reproduction : Small companion animals proceedings*. Sydney, 8-12 août 1988. Sydney : Post Graduate in Veterinary Science, 69- 87

JOHNSTON SD, ROOT KUSTRITZ MV, OLSON PNS. Canine and Feline Theriogenology. Philadelphia: WB Saunders, 2001, 592p

KREEGER TJ, SEAL US. (1992) Circannual prolactin rhythm in intact dogs housed outdoor. *In: Chronobiologia*, **19**, 1-8

LINDE-FORSBERG C, WALLÉN A. (1992) Effects of whelping and season of the year on the interoestrous intervals in dogs. *J. small Anim. Pract.*, **33**, 67-70

LINDE-FORSBERG C, WALLÉN A. (1992) Effects of whelping and season of the year on the interoestrous intervals in dogs. *J. small Anim. Pract.*, **33**, 67-70.

LENNOZ M. Physiologie de la reproduction. *Point Vet.*, 1978, **7**, 11-17

OLSON PN, BOWEN R., BEHRENDT MD, OLSON JD, NETT TM. (1984) Concentrations of progesterone and luteinizing hormone in the serum of diestrous bitches before and after hysterectomy. *Am. J. Vet. Res.*, **45** (1), 149-153

OLSON PN, THRALL MA, WYKES PM, HUSTED PW, NETT TM, SAWYER HR Jr. (1984) Vaginal cytology. Part I. A useful tool for staging the canine estrous cycle. *Comp. Cont. Ed. Pract. Vet.*, **6** (4), 288-297

OLSON PN, HUSTED PW, ALLEN TA, NETT TM. (1984) Reproductive endocrinology and physiology of the bitch and queen. *Vet. Clin. North Am. [Small Anim. Pract.]*, **14** (4), 927-946.

ROMAGNOLI S. Control of reproduction in dogs and cats: use and misuse of hormones. *Proceedings of the world congress WSAVA, 2006*, [<http://www.ivis.org>].

ROMAGNOLI S. Recent advances in canine female reproduction. *Proceedings of the world congress WSAVA, 2006*, [<http://www.ivis.org>].

SOKOLOWSKI JH. (1977) Reproductive patterns in the bitch. *Vet. Clin. North Am.*, 7 (4), 653-666.

SOKOLOWSKI JH, ZIMBELMAN RG, GOYINGS LS. (1973) Canine reproduction : reproductive organs and related structures of the nonparous, parous, and postpartum bitch. *Am. J. Vet. Res.*, **34**, 1001-1013.

STRASSER H, SCHUMACHER W. (1968) Breeding dogs for experimental purposes. II : Assessment of 8-year breeding records for two beagle strains. *J. small Anim. Pract.*, **9**, 603-612.

SOKOLOWSKI JH. (1977) Reproductive patterns in the bitch. *Vet. Clin. North Am.*, 7 (4), 653-666.

SHILLE VM. (1989) Reproductive physiology and endocrinology of the female and male. In ETTINGER SJ, editor. *Textbook of veterinary internal medicine*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1777-1786.

TEDOR JB, REIF JS. (1978) Natal patterns among registered dogs in the united states. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **172**, 1179-1185.

VERSTEGEN J., ONCLIN K. Estrus control in the bitch. *Proceedings of the world congress WSAVA, 2002*, [<http://www.ivis.org>].